

THÈSE

53

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1934

PAR

A. H. CHAMBAZ *Auguste Hermann*

né le 12 août 1910, à Chambéry (Savoie)

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES SUR LES SUBSTANCES LIPIDIQUES ET LIPOIDIQUES

EXTRAITES DES BACILLES TUBERCULEUX TUÉS PAR LA CHALEUR

ÉTUDE DE LEUR POUVOIR HAPTÈNE

Travail du laboratoire de chimie de la tuberculose de l'Institut Pasteur de Paris et du laboratoire de la chaire de microbiologie et des maladies contagieuses de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

JURY { *Président :* M. LEMIERRE, professeur à la Faculté
de Médecine de Paris.
Membres : MM. PANISSET et VERGE, professeurs
à l'Ecole vétérinaire d'Alfort.

CHAMBÉRY

IMPRIMERIES RÉUNIES, 3, RUE LAMARTINE

1934

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES
SUR LES SUBSTANCES LIPIDIQUES
ET LIPOIDIQUES

Extraites des bacilles tuberculeux tués par la chaleur

ÉTUDE DE LEUR POUVOIR HAPTÈNE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1934 — N°

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1934

PAR

A.-H. CHAMBAZ *Auguste Hermann*

né le 12 août 1910, à Chambéry (Savoie)

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES SUR LES SUBSTANCES LIPIDIQUES ET LIPOIDIQUES

EXTRAITES DES BACILLES TUBERCULEUX TUÉS PAR LA CHALEUR

ÉTUDE DE LEUR POUVOIR HAPTÈNE

Travail du laboratoire de chimie de la tuberculose de l'Institut Pasteur de Paris et du laboratoire de la chaire de microbiologie et des maladies contagieuses de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

JURY { *Président :* M. LEMIERRE, professeur à la Faculté
de Médecine de Paris.
Membres : MM. PANISSET et VERGE, professeurs
à l'Ecole vétérinaire d'Alfort.



CHAMBÉRY

IMPRIMERIES RÉUNIES, 3, RUE LAMARTINE

1934

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P. J. CADIOT et H. VALLÉE, inspecteur général honoraire des services vétérinaires.

Directeur : M. Ch. BRESSOU, directeur de l'Institut de Médecine vétérinaire exotique.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, inspecteur général honoraire des Ecoles vétérinaires ; P. J. CADIOT, H. VALLÉE, DECHAMBRE, NICOLAS.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

Chaires	MM.
1 ^o Physique, chimie et toxicologie. Pharmacie	NICOLAS
2 ^o Parasitologie et maladies parasitaires. Dermatologie et séméiologie de la peau. Zoologie appliquée. Clinique des maladies parasitaires et dermatologique	HENRY
3 ^o Anatomie descriptive, systématique, topographique et appliquée des animaux domestiques	BRESSOU MAIGNON
4 ^o Physiologie. Thérapeutique générale	
5 ^o Pathologie générale et anatomie pathologique générale, histologie, embryologie, tératologie. Technique des autopsies. Autopsies médico-légales	PETIT
6 ^o Pathologie médicale ; séméiologie et propédeutique. Jurisprudence vétérinaire. Médecine légale. Déontologie. Clinique médicale	ROBIN
7 ^o Pathologie chirurgicale, séméiologie. Médecine opératoire et ferrure. Clinique chirurgicale	COQUOT
8 ^o Pathologie bovine, ovine, caprine et porcine ; maladies des animaux de basse-cour. Séméiologie. Médecine opératoire. Obstétrique. Clinique spéciale	LESBOUYRIES
9 ^o Maladies microbiennes et police sanitaire. Microbiologie. Clinique spéciale	PANISSET
10 ^o Zootechnie et appréciation des animaux domestiques. Economie rurale	LETARD
11 ^o Agronomie et hygiène. Botanique et aliments du bétail. Matière médicale	SIMONNET
12 ^o Industrie et contrôle des viandes, du lait et de ses dérivés. Industrie et contrôle des autres produits animaux	VERGE

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BERTHELON	MM. GORET
BRION	MONVOISIN
CARPENTIER	MOUSSU
M. VALADE	

AGRÉGÉS CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

MM. CORDIER et THIEULIN

La Faculté de Médecine et l'Ecole vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



A MA MÈRE,

A MON PÈRE,

En témoignage d'affection et de profonde reconnaissance.

A MA FIANCÉE.

A TOUTE MA FAMILLE.

A Monsieur MACHEBŒUF,

Docteur ès sciences,

Docteur en médecine,

Chef de service à l'Institut Pasteur de Paris.

A Monsieur GORET,

Chef de travaux à l'Ecole d'Alfort.

A Monsieur le Professeur LEMIERRE,

*Médecin des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,*

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury.

A Monsieur le Professeur PANISSET,

Chevalier de la Légion d'honneur,

et à Monsieur le Professeur VERGE,

de l'Ecole d'Alfort,

*qui ont bien voulu faire partie du Jury de notre thèse,
hommages très respectueux.*

A tous mes Maîtres de l'Ecole d'Alfort.

INTRODUCTION

L'étude chimique du bacille tuberculeux, poussée jusqu'à l'obtention de corps purs, parfaitement définis, doit permettre de circonscrire plus étroitement le problème biologique du bacille et de la tuberculose.

Il est, en effet, indispensable de connaître la nature chimique des composés dont les recherches biologiques, succédant aux recherches chimiques, ont révélé l'activité, le pouvoir antigène notamment.

Le cas de la tuberculine étudiée par Mueller est un exemple frappant de la nécessité de la « dissection » du bacille ou de ses produits sécrétés dans les milieux de culture.

Cet auteur ainsi que Laidlaw et Dudley ont isolé de la tuberculine un polysaccharide, précipitant à une excessive dilution l'immunsérum correspondant, alors que l'intradermoréaction est due à une albumine, qui, elle, ne donne pas de réaction précipitante.

La constitution chimique du bacille a fait l'objet de nombreuses recherches. Elles ont déjà conduit à des résultats importants relativement à la constitution chimique elle-même et aux propriétés biologiques des composés isolés, mais ces résultats sont encore bien minimes, à côté de ceux que laissent entrevoir ces premiers travaux.

Dans le groupe des protides, Ruppel a extrait un acide nucléinique, auquel on rapporte généralement les effets de la tuberculine.

Coghill, d'autre part, a constaté l'activité de certaines albumines bacillaires et a remarqué que leur action physiologique paraissait en rapport avec l'intensité de la réaction de Mölisch, ce qui montre l'importance du groupe hydrocarboné.

Le Guyen, Albert Weil, Seibert et Munday, poussant plus loin la séparation des différents composés des mélanges complexes que représentent ces albumines, ont montré que la partie active semblait dialysable et, par conséquent, de poids moléculaire assez faible.

Le rôle des glucides dans la réaction de précipitation, mis en évidence par Mueller, Laidlaw et Dudley dans leurs recherches

sur la tuberculine, constitue également un fait du plus grand intérêt.

L'étude chimique des lipides bacillaires, dont l'importance biologique et pathologique est considérable, s'est avérée plus difficile encore. Les substances grasses ont, en effet, des caractères de solubilité extrêmement voisins ; leur séparation, leur fractionnement, leur purification sont, dès lors, très malaisés.

Au surplus, les lipides entraînent facilement, au cours de leur dissolution, des composés non lipidiques, qui, pris isolément, ne se dissoudraient pas dans les solvants des graisses, de telle sorte qu'on peut se trouver dans l'incertitude quand il s'agit de déterminer d'une manière précise le substratum chimique de telle ou telle propriété biologique.

Ces entraînements sont fréquents : les solutions obtenues lors de la préparation d'extraits par les solvants des graisses présentent souvent un aspect colloïdal, ce qui fait penser à la présence de corps autres que les glycérides et les cires.

Les lipides bacillaires contiennent, d'autre part, des sucres, dont le rôle biologique est encore à préciser, du phosphore et de l'azote, sous une forme complexe et à peu près inconnue.

Du point de vue biologique, Auclair et quelques autres ont constaté l'action tuberculisante des extraits étherés ou chloroformiques et Boquet et Nègre ont nettement établi la fonction antigénique des diverses fractions lipidiques (graisses, lipoïdes, cires), groupes déjà assez bien différenciés, mais constitués encore par des mélanges complexes.

Goris puis Anderson, poussant beaucoup plus loin que ne l'avait fait Auclair, l'analyse de la matière grasse, ont fait de très intéressantes remarques sur les acides gras et les autres substances libérées par saponification.

Anderson, notamment, a fait porter plus particulièrement ses investigations sur les phospholipides et les cires et en a isolé des acides gras saturés liquides ou à point de fusion très bas, doués de pouvoir rotatoire et auxquels il rapporte, avec Sabin et Doan, l'activité physiologique.

Mais leurs tentatives de saponification ont toujours porté sur des mélanges complexes de lipides et leurs très beaux travaux ne nous renseignent que superficiellement sur les principes immédiats lipidiques du bacille.

Dans le but de combler cette lacune, Machebœuf et ses collaborateurs, reprenant la question, consacrent, depuis plusieurs années déjà, à l'étude des lipides bacillaires de longues et délicates recherches. Elles se poursuivent actuellement.

Ces auteurs se sont proposé d'extraire du bacille de Koch ses divers principes immédiats lipoïdiques, sans les dénaturer, sans les décomposer, puis de les isoler à l'état pur ou tout au moins de séparer divers ensembles constitués seulement par des mélanges de substances chimiques assez voisines, pour qu'ils puissent avoir des renseignements précis sur leur nature chimique et sur leur activité biologique.

Pressentant que le chauffage doit dénaturer ou oxyder certaines substances lipidiques ou autres, ils ont fait porter leurs recherches plus particulièrement sur les bacilles vivants ; mais, dans le but « de poser, d'abord, quelques jalons » et de se rendre, par la suite, un compte exact des modifications produites par la chaleur, au point de vue biologique comme au point de vue chimique, ils ont auparavant étudié les bacilles chauffés.

A l'heure actuelle, seuls les résultats de cette investigation préliminaire ont été publiés. Ceux obtenus avec l'autre matière première (bacilles vivants) ne seront rapportés qu'ultérieurement.

Ces premières recherches, qui ont permis d'extraire, puis de purifier, parfois jusqu'à un très haut degré, un certain nombre de substances intéressantes, ont ouvert la voie aux recherches biologiques (étude du pouvoir haptène, du pouvoir antigène in vivo, etc., des fractions isolées).

C'est à l'étude du premier point (pouvoir haptène) que nous avons consacré nos modestes recherches.

Elles nous ont conduit à reporter dans un cercle chimique plus étroit, à localiser sur un groupe de principes immédiats, vraisemblablement très voisins, le pouvoir haptène des lipides bacillaires, que Boquet et Nègre, en raison de l'état moins avancé du fractionnement chimique, rapportaient à un mélange, à une « mosaïque » plus complexe.

Nous exprimons à M. Machebœuf, chef du laboratoire de chimie de la tuberculose de l'Institut Pasteur de Paris, à qui nous devons l'idée de ce travail, notre profonde gratitude pour les conseils qu'il nous a prodigués lors de nos passages à son laboratoire, où il nous a toujours réservé le plus bienveillant accueil. Les documents qu'il a mis à notre disposition, ont été pour nous une aide précieuse.

Nous tenons à remercier M. Goret, chef de travaux à l'Ecole d'Alfort, de l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter au cours de nos études. Les encouragements et les nombreux services qu'il nous a rendus, nous ont grandement facilité notre tâche.

Nous exprimons, enfin, notre vive reconnaissance à M. le Vétérinaire Commandant Marcenac, agrégé des Ecoles vétérinaires, professeur à l'Ecole militaire de Saumur, qui, lors de notre séjour à l'Ecole, nous fit l'honneur de nous accueillir dans son laboratoire pour nous permettre de terminer l'expérimentation de notre thèse.

Après avoir donné un aperçu sommaire sur les glucides, protides et substances minérales du bacille tuberculeux, afin de fixer dans un cadre chimique plus complet les résultats de nos recherches, nous exposons, d'une manière détaillée, dans la première partie de cette thèse, avec les résultats des recherches qui les ont précédés (recherches de Goris et d'Anderson), les travaux récents de Machebœuf et de ses collaborateurs, sur l'extraction des principes immédiats lipidiques et lipoïdiques des bacilles tués par la chaleur, lesquels nous ont fourni les éléments de base de nos recherches et dont celles-ci ne constituent qu'un complément utile et opportun.

Par ailleurs, le choix judicieux, comme étalons de nos mesures, des antigènes classiques de Boquet et Nègre et de Besredka, nous a d'autre part conduit logiquement, pour terminer cette partie préliminaire, à réserver à ces derniers une courte étude.

La deuxième partie est consacrée intégralement à l'exposé de nos recherches (procédé sérologique utilisé, préparation des différents éléments de la réaction : mise en émulsion des fractions à examiner, pouvoir anticomplémentaire, et enfin, les résultats de la mesure de leur pouvoir haptène).

L'intérêt très grand qu'il y a, à notre sens, à réunir dans une même étude les deux points de vue : constitution chimique et pouvoir antigène, dont on ne saurait nier l'intime connexité, nous a incité à adopter pour notre thèse ce mode d'exposition.

Nous espérons, que, formant ainsi un ensemble plus complet et plus harmonieux, sa lecture par un non-spécialiste en sera de beaucoup facilitée.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

APERÇU SOMMAIRE SUR LES GLUCIDES, PROTIDES ET MATIÈRES MINÉRALES DU BACILLE TUBERCULEUX

Nous examinerons très rapidement dans ce court chapitre, les résultats successivement obtenus à ces différents points de vue, dans les nombreux travaux traitant de la constitution chimique du bacille parus depuis 1895.

Etant donné, d'autre part, la nature et le but de notre thèse, il nous a paru utile de donner, le cas échéant, quelques brèves indications sur ce que l'on sait actuellement du pouvoir antigène *in vitro* des divers éléments isolés lors de ces recherches.

Observations préliminaires.

Le poids moyen d'un bacille tuberculeux est approximativement de 25 cent-millionièmes de milligramme. D'après Deeg et Nebel, sa densité oscille entre 1.010 et 1.080. Il en résulte — et c'est une de ses caractéristiques — qu'il présente une tendance très nette à tomber au fond des liquides de culture, et de ce fait, son développement sur la plupart des milieux artificiels n'est réalisé que lorsqu'il se trouve en amas constitués surtout par des éléments jeunes, ceux-ci pouvant se maintenir en surface.

La teneur en eau est variable avec l'âge, les conditions de la culture et la nature des milieux. D'après les recherches d'Hamerschlag, elle serait en moyenne de 85,9%.

SECTION I

Constitution minérale.

En vue de l'étude de leur constitution minérale, les bacilles préalablement traités par l'alcool et l'éther (séparation des lipides) sont séchés à 100° et calcinés (destruction des protides et des glucides).

Puis les cendres obtenues sont analysées. Depuis la découverte du bacille, sa constitution minérale a fait l'objet des travaux d'Hammerschlag (1891), de Bouveault (1892), de Schweinitz et Marion Dorset (1898), de Kressling (1901), de Behring (1907), de Kraus et Siebert (1909) et enfin, de Goris, qui, en 1920, publia un important travail sur la constitution chimique du bacille.

Tous, dans l'ensemble, ont isolé les mêmes éléments. Quelques exceptions seulement sont à signaler sur ce point. Cela tient vraisemblablement aux différentes manipulations subies par les bacilles avant leur analyse, lesquelles n'ont pas été dans le détail, exactement les mêmes pour toutes les recherches.

Acide phosphorique, sodium, potassium, calcium, chlore, acide sulfurique, magnésium, silicium, ont pu, mais, avec des taux variables, être décelés. Des traces de fer, de manganèse et de zinc ont été signalées. Toutefois, l'acide phosphorique a toujours été trouvé en grande quantité (50% des cendres en moyenne). Il en a été trouvé jusqu'à 74% dans les bacilles humains atténués.

Fait intéressant pour nous, — puisque nos recherches ont porté sur les phospholipides, — la richesse en phosphore suit les oscillations de la richesse en lipides.

Pour Goris, les phosphates forment 43,4% de la masse totale, puis viennent les sulfates (22,8%).

Mais si les résultats sont dans l'ensemble comparables au point de vue qualitatif, il n'en est pas de même au point de vue quantitatif. Nous avons dit précédemment que les chercheurs avaient trouvé des taux non semblables pour les différents éléments décelés, mais c'est surtout relativement à la teneur en cendres des bacilles tuberculeux qu'il y a diversité dans les résultats (2,3%, Schweinitz et Dorset ; 8%, Hammerschlag).

Ces écarts paraissent tenir au fait que la proportion des matières extraites des corps bacillaires augmente avec la concentration des milieux en sels inorganiques et diminue avec l'âge des cultures ; c'est ce qu'ont pu constater, en 1926, A. Frouin et Guillaume, lesquels ont remarqué que les cultures de 16 jours, correspondant sensiblement au maximum du développement, renferment environ deux fois plus de matières minérales que celles de 40 jours.

SECTION II

Glucides.

Dans le bacille tuberculeux, les glucides peuvent exister à l'état libre ou engagés dans des combinaisons complexes, comme les phosphatides, les cires ou certaines substances protidiques.

La quantité des glucides varie suivant la nature du milieu et l'origine du bacille : A. Berthelot a montré que dans l'hydrolyse totale par l'acide sulfurique à 20 %, le bacille humain était le plus riche en glucides et le bacille aviaire le plus pauvre. Mais ce sont là des notions de quantité, qui sont moins importantes que la nature des glucides elle-même.

Après avoir traité les corps microbiens à chaud par une solution d'acide chlorhydrique à 5 %, Bendix, en 1901, a obtenu une substance fournissant avec l'osazone, la réaction caractéristique des pentoses. Bendix estime que ces pentoses proviendraient de la décomposition des nucléoprotéides des bacilles, et Ruppel, des composés analogues à la chitine, à la kératine et à la fibrine.

D'autre part, si on reprend par l'acide sulfurique concentré des corps bacillaires dégraissés par l'alcool et l'éther, qui viennent d'être traités par une solution de soude à 1 %, il se forme un précipité soluble dans une solution cupro-alkaline. Hamerschlag pense qu'il s'agit d'une cellulose ; Dreyer, d'une hémicellulose ; et Paris, d'une hydrocellulose, cette dernière se colorant en bleu après action sur elle d'une solution d'iode.

Par ailleurs, Baudran, en 1906, prétend que le bacille contient une cellulose donnant la réaction bleue avec l'iode et se dissolvant si on la traite par le chlorure de zinc et l'acide chlorhydrique en parties égales.

Panzer (1912), par macération des bacilles dans de l'eau chaude, en a extrait une substance analogue à la gomme. L'analyse chimique n'a permis d'y déceler ni azote, ni phosphore, ni soufre. En l'hydrolysant par l'acide chlorhydrique, elle donne des produits réduisant la liqueur de Fehling et donnant la réaction de Mölisch au naphthol. Cette dernière caractéristique semble indiquer qu'il s'agirait plutôt d'une pectine que d'un galactoholoside.

La présence de substances donnant par hydrolyse des « oses » a été également constatée par Kozniewski.

Laidlaw et Dudley, en 1915, ont extrait une substance comparable au glycogène de par ses caractères physiques et chimiques et un hétéroside, de nature très complexe, ressemblant aux gommes.

Fait intéressant, cette substance est précipitable par les sérums antituberculeux (présence de précipitines).

Etudiant le pouvoir antigène, il eût été intéressant pour nous de compléter la mise en évidence de son affinité pour les précipitines par celle de son affinité pour les sensibilisatrices, et comparativement aux lipides, d'en mesurer le pouvoir haptène. Mais nos recherches ne portant que sur les substances lipidiques, nous n'avons disposé que des fractions correspondantes et il nous a été impossible de nous procurer quelques milligrammes de cet hétéroside.

Mueller a retiré de la tuberculine un composé analogue, de nature hydrocarbonée, possédant également la propriété de précipiter l'immunsérum correspondant. Ce composé avait un pouvoir rotatoire dextrogyre $\alpha_D = + 17^{\circ}3$ et après hydrolyse un pouvoir rotatoire gauche $\alpha_D = - 22^{\circ}4$. Il donnerait 99 % de sucre réducteur exprimé en glucose. Toutefois, avec la liqueur d'hydrolyse, la réaction des pentoses était positive.

Il est vraisemblable que les composés isolés par Laidlaw et Dudley, puis par Mueller, ne sont qu'une seule et même substance, ou tout au moins des substances très voisines. Mascini extrait de bacilles cultivés sur milieu synthétique, des sucres parfaitement définis : mannose, arabinose, et un acide sucré non encore identifié. Ce polysaccharide précipiterait également les sérums antituberculeux (dose : 1/6.000.000).

Au cours de son étude sur les phosphatides, Anderson avait constaté que la « cire purifiée » — qu'il considère plutôt comme

un phosphatide — donnait après dédoublement par les acides 33% de produits solubles dans l'eau. Anderson et Renfrew montrèrent alors qu'à côté de l'acide glycérophosphorique, cette solution aqueuse renfermait des sucres réducteurs donnant avec la phénylhydrazine une glucosazone.

Anderson et Roberts ont trouvé du mannose et de l'inosite dans les phosphatides du B. K. bovin. Ces composés ont été décelés par la suite dans les B. K. humain et aviaire.

Selon Anderson, les acides gras et l'acide glycérophosphorique seraient unis au mannose par éthérification.

Enfin, nous verrons, dans le prochain chapitre, que les fractions extraites récemment par Machebœuf en faisant agir le chloroforme et l'éther sur des bacilles tués et préalablement épuisés par l'acétone et l'alcool, donnent par hydrolyse, des sucres réducteurs (des oses).

SECTION III

Protéides.

L'étude des protéides du B. K. ne peut être entreprise avec succès qu'en employant des microbes développés sur des milieux synthétiques ne renfermant aucune matière albuminoïde (albumines, peptones) risquant de jeter un trouble sur les résultats. Ce milieu pourra contenir un acide aminé, mais il convient de le choisir le plus simple possible, très facile à caractériser et aussi à éliminer ; l'asparagine, qui est le plus couramment employée, convient parfaitement.

Mais ces recherches analytiques seraient simplifiées si l'on pouvait employer un milieu complètement minéral avec un sel ammoniacal comme source d'azote.

Les protides formés par le bacille se trouvent dans le milieu de culture ou dans les corps microbiens. Il y a de fortes présomptions pour que les produits soient identiques dans les deux cas, mais il se peut aussi que l'on trouve dans la solution des produits

plus solubles, plus dégradés et dans les bacilles, des composés plus complexes, moins solubles.

On peut y rencontrer tous les protides susceptibles d'être fabriqués par une cellule végétale : globuline, albumine, nucléo-albumine, etc., et leurs produits de décomposition : albumoses, peptones, polypeptides, acides aminés ; on pourrait même envisager la présence d'alcaloïdes.

Les premières recherches ont naturellement été faites avec des bacilles cultivés sur bouillons, ou sur des bouillons concentrés (tuberculine). Ne sont mentionnées ici que celles apportant quelques indications sur la constitution chimique des substances protidiques, avec, toutefois, la restriction que ces composés peuvent provenir du milieu lui-même, surtout lorsqu'on opère sur des bouillons microbiens. En utilisant des corps bacillaires bien lavés avant de pratiquer le dégraissage, on est déjà moins exposé à commettre des confusions. Nous ne retiendrons donc que les recherches faites sur les corps bacillaires lorsque la culture aura été faite sur milieu synthétique.

Dès la découverte du bacille, Koch puis Hammerschlag avaient constaté dans cet organisme la présence d'une matière albuminoïdique. Ils l'obtenaient en traitant les corps bacillaires par une solution alcaline ; cette solution, acidifiée par l'acide acétique et traitée par le sulfate d'ammoniaque, fournissait un précipité donnant les réactions des xanthoprotéides et du biuret. De la tuberculine brute (bouillons de culture concentrés), Koch obtint, par précipitation à l'aide de l'alcool et dans certaines conditions, une masse grisâtre très soluble dans l'eau, et présentant les caractères des albuminoïdes.

Nous ne mentionnerions pas cette expérience si Koch n'avait également préparé de la tuberculine provenant de culture sur milieu synthétique de Proskauer et Beck et n'avait constaté que cette tuberculine, provenant d'un milieu exempt d'albumine, donnait des réactions des matières protidiques.

Auclair et Paris, traitant les bacilles dégraissés par l'acide acétique concentré, obtiennent une matière albuminoïque qu'ils classent dans le groupe des paranucléoalbumines, et à laquelle ils donnent le nom de *bacillocaséine*.

Baudran, par traitement des corps bacillaires avec l'acide chlorhydrique à 1%, prétend avoir obtenu de 50 à 60% de substances albuminoïdiques.

Ruppel, partant des bacilles cultivés sur bouillon, aurait isolé, par des traitements à l'acide sulfurique à 1% une protamine, appelée par lui *tuberculosamine*.

La présence de ce corps a été très discutée, mais ce qui ne l'est pas, c'est la présence d'un acide nucléique spécial, dénommé *acide tuberculinique* par Ruppel, et qui, d'après von Behring, serait le vrai poison tuberculeux.

Kitajima aurait isolé l'acide tuberculo-thymique, qu'il prétend être analogue à l'acide thymonucléique. L'étude de ces composés nucléiniques — déjà signalés par Klebs comme existant en grande abondance dans le B. K., a fait l'objet de nombreux travaux de la part de Levène, Johnson et Coghill, Brown, Coghill; ces auteurs ont généralement opéré sur des bacilles cultivés sur milieu synthétique.

Levène, par traitement des bacilles préalablement dégraissés avec une solution de chlorure de sodium à 5% ou de chlorure d'ammonium à 8%, isole un acide nucléinique existant à l'état libre. L'extraction alcaline lui donne une nouvelle quantité d'acide nucléinique provenant de la décomposition d'une nucléoprotéine.

De cet acide nucléique, il retire les bases puriques : la *guanine* et l'*adénine*.

Après hydrolyse sulfurique de cet acide nucléinique, pour l'isolement duquel ils ont indiqué une méthode, Johnson et Brown ont pu caractériser deux bases pyrimidiques : la *thymine* et la *cytosine*. Plus récemment, Johnson et Coghill isolèrent une troisième base pyrimidique : la *méthyl 5 cytosine*. La nature du sucre qui entre dans la composition de ce composé nucléinique est également connue. Goris, qui avait isolé une nucléoalbumine de bacilles dégraissés, mais cultivés sur bouillon, y avait signalé la présence d'un hexose.

Brown et Johnson, par hydrolyse à l'HCl (densité : 106), constatent la présence, dans le liquide d'hydrolyse, d'acide lévulinique, caractérisée par la réaction de l'iodoforme et la coloration rouge du nitroprussiate de soude et d'acide formique dans le distillat, acides qui ne peuvent provenir que de la décomposition d'un sucre en C⁶.

Les différentes fractions constitutives de cet acide nucléinique sont donc maintenant connues, de sorte que la constitution de l'acide tuberculinique apparaît comme un peu particulière.

Elle s'éloigne de celle de l'acide nucléinique des végétaux (acide phytonucléinique) et en particulier de celle de la levure, pour se rapprocher de l'acide nucléinique du thymus et des animaux (acide zoonucléinique).

Cet acide tuberculinique serait formé de 4 molécules, dont les bases puriques seraient la guanine et l'adénine et les bases pyrimidiques la cytosine et la thymine. On pourrait représenter sa formule par le schéma suivant, sans préjuger de l'arrangement des molécules :

Acide phosphorique — Hexose — Guanine
 Acide phosphorique — Hexose — Adénine
 Acide phosphorique — Hexose — Thymine
 Acide phosphorique — Hexose — Cytosine

La différence avec l'acide nucléinique de la levure consisterait en le remplacement de la thymine par une autre base pyrimidique : l'*uracile*.

Mais il existe encore une autre différence dans la nature des sucres entrant dans ces composés complexes.

Le sucre de l'acide nucléinique de la levure a été identifié avec le ribose, tandis que le sucre de l'acide nucléinique du bacille tuberculeux — comme celui, d'ailleurs, de l'acide nucléinique du thymus — serait un sucre en C⁶, que l'on ne connaît que par ses produits de décomposition : l'acide lévulinique CH³ — CO — CH² — CH² — COOH (acide acétyl propionique) et l'acide formique.

Brown et Johnson pensent que l'acide tuberculinique serait plutôt un trinuéclotide comme l'acide nucléique extrait de la levure, et ils lui assignent la formule suivante :

Acide phosphorique — Hexose — Adénine — C⁵H⁴N⁵
 |
 Acide phosphorique — Hexose — Thymine — C⁵H⁵N²O²
 |
 Acide phosphorique — Hexose — Cytosine — C⁴H⁴N³O

Il faudrait admettre que dans l'acide nucléinique du B. K. le groupement guanine n'existerait pas.

En réalité, il semble plutôt que le composé existant dans le corps bacillaire serait bien un tétranucléotide, mais le groupe guanine, étant très labile, disparaîtrait au cours des traitements et le corps isolé serait un trinuéclotide.

Quant à la base pyrimidique, méthyl 5 cytosine, on ne peut pas savoir de quel groupement elle fait partie, et l'on peut envisager un autre composé nucléinique dans lequel la base cytosine serait remplacée par un homologue.

A côté de cet acide tuberculinique, dont l'étude, déjà bien avancée, a surtout retenu l'attention des chercheurs, il faut citer les recherches de Coghill, qui s'est occupé de la fraction albuminoïdique du B. K. Par extraction soit à l'eau pure, soit au moyen d'une solution de NaCl, il obtient une substance albuminoïdique ne paraissant pas contenir de globuline. La réaction de Mölisch fortement positive indique la présence de groupes sucrés.

L'extraction alcaline, par contre, permet d'isoler une quantité beaucoup plus grande d'une substance à réaction de Mölisch plus atténuée.

Contrairement à la fraction soluble en milieu neutre, cette dernière est pratiquement dépourvue d'activité biologique.

Il est intéressant de voir réapparaître ici l'importance des groupes sucrés si bien mis en évidence par Laidlaw et Dudley.

Il faut encore citer la présence dans le B. K. de globuline isolée par Coghill.

Quant à la nature des albumines, elle a été étudiée par Johnson et Brown puis par Kempff Campbell. Ils y ont décelé surtout des bases monoaminées, de l'arginine, de l'acide glutamique, de l'histidine, de la lysine, de la tyrosine, du tryptophane, etc.

En raison de la forte teneur en arginine, d'une part, de l'absence de substances autres que des aminoacides, d'autre part, il semble qu'on doive classer le protéide bacillaire dans les holo-protéides et le rapprocher des histones.

En résumé, de tous les protides isolés du B. K., c'est la fraction nucléoprotéidique qui paraît la plus intéressante. La globuline existe en très faible quantité. L'albumine et la fraction protidique soluble dans NaOH ne semblent avoir aucune propriété biologique.

Le pouvoir antigène *in vitro* des produits bacillaires a fait l'objet des recherches récentes de Dienes et J. Freund (1926). D'après eux, il y aurait en dehors des lipides complexes solubles dans l'alcool — comme nous le verrons en détail dans la deuxième partie de la thèse, puisque nos mesures ont porté exclusivement sur les substances lipidiques et lipoïdiques — deux autres subs-

tances qui seraient susceptibles de fixer l'alexine en présence d'un sérum antituberculeux : les protides et l'hétéroside complexe, dont nous avons parlé à propos des glucides.

Mais leurs essais de mesure du P. A., outre qu'ils ne visaient que le point de vue qualitatif, n'ont porté que sur la fraction totale des protides, de telle sorte que si leurs résultats démontrent l'existence d'un pouvoir antigène en faveur des protéides, ils ne nous renseignent nullement dans quelles sous-fractions ou principe immédiat se localise ce pouvoir.

CHAPITRE II

LES SUBSTANCES LIPIDIQUES ET LIPOIDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX

Nos recherches immunologiques ayant porté exclusivement sur les substances lipidiques et lipoidiques du bacille, auxquelles ce dernier doit en grande partie ses propriétés d'acidorésistance et ses principaux caractères biologiques, il nous a paru opportun de réserver un chapitre au rappel des différents travaux dont elles ont fait l'objet jusqu'en ces dernières années, et plus particulièrement, à un exposé complet des très récentes extractions de Machebœuf et de ses collaborateurs, lesquelles — et nous l'avons déjà dit — nous ont fourni les matériaux de notre étude et dont celle-ci n'est en définitive qu'un prolongement rationnel dans le domaine sérologique.

Dans le but de marquer plus nettement — et la clarté et la commodité de l'exposé ne peuvent qu'y gagner — les principales étapes de l'étude chimique des lipides du bacille depuis sa découverte par Robert Koch, en 1882, nous avons divisé ce chapitre en quatre sections :

1^o En premier lieu, nous énumérons brièvement, avec leurs résultats, les travaux antérieurs aux recherches de Goris.

2^o La deuxième section est consacrée à l'exposé des conclusions *relatives aux lipides* de l'important travail que Grois publia en 1920.

3^o Suivant toujours l'ordre chronologique, nous exposons dans la troisième section les résultats obtenus par Anderson dans ses recherches sur les lipides bacillaires.

4^o Enfin, l'étude complète des recherches de Machebœuf constitue la quatrième section, étude très complète pour les fractions que nous avons pu émulsionner, et par conséquent titrer, et plus brèves pour celles dont la mise en émulsion, malgré les artifices employés, n'a pu être réalisée.

SECTION I

Les travaux antérieurs aux recherches de Goris.

De tous les microbes connus, le bacille tuberculeux est celui dont on peut extraire la plus grande quantité d'acides gras et de substances lipidiques. Leur extraction, leur isolement présentent un très grand intérêt, car le bacille leur doit en grande partie ses propriétés d'acidorésistance et ses principaux caractères biologiques, son pouvoir antigène notamment.

Ces substances, de constitution très complexe, étant difficiles à séparer en totalité, il en résulte — et cela se conçoit — que les recherches des différents auteurs qui se sont occupés de leur étude ont conduit à des résultats très différents. Par ailleurs, la teneur des bacilles en lipides varie — et cela complique encore le problème — avec leur origine (bacilles humains ou bovins), l'âge des cultures, les divers milieux employés pour les obtenir, la température et le degré d'épuisement.

C'est ainsi que Terroine et Lobstein trouvent le B. K. bovin plus riche en lipides que le B. K. humain. Mais Anderson et Roberts obtiennent des résultats contraires, le B. K. bovin étant le plus pauvre.

Long et Campbell ont dosé les lipides d'un grand nombre de bacilles acidorésistants. Ils ont remarqué que le B. K. aviaire ne contenait que 11% de lipides, alors que les B. K. humain et bovin en renfermaient 22%. En ce qui concerne les variations rattachables à la composition du milieu de culture, Levène semble avoir été le premier à remarquer la différence des teneurs en lipides des B. K. cultivés en un milieu synthétique (22,2%) et en bouillon (31,56%).

Frouin obtient 24,9% pour milieu synthétique et 35,8% pour la même souche cultivée sur bouillon.

Frouin puis Terroine et Lobstein remarquent qu'en remplaçant le glycérol par des sucres, le glucose en particulier, on observe une diminution notable des lipides.

Les résultats quantitatifs dépendent également du solvant employé. Les solvants utilisés au cours des recherches que nous

mentionnons ont été soit l'alcool et l'éther, soit encore l'éther, l'alcool et le chloroforme, soit encore ces derniers complétés par le benzol. Machebœuf a employé en plus, au début de l'extraction, l'acétone, et il a pu, ainsi, du fait du nombre réduit de substances lipidiques susceptibles de se dissoudre dans ce solvant, obtenir une fraction déjà assez nettement différenciée.

Il n'est donc pas surprenant qu'à l'égard de la proportion de lipides extraits des bacilles, la diversité des résultats obtenus soit frappante.

Pour Hammerschlag, la proportion des matières extractibles par les dissolvants des graisses est de 27,2% du poids des bacilles secs, alors qu'elle atteint, avec les recherches de Frouin et Agulhon (1919), le maximum de 42%, les différents taux intermédiaires ayant été trouvés par Arouson (1898), Levène (1910), Kressling (1901), von Schweinitz et Dorset, Baudran, etc.

Frouin estime que le pouvoir des dissolvants à l'égard des lipides est par ordre croissant : acétone, chloroforme, éther, alcool absolu.

On comprend dès lors, en raison de la diversité des dissolvants employés, pourquoi les résultats obtenus au cours des nombreuses recherches sont si différents.

Auclair et Paris, en faisant agir successivement l'alcool, l'éther et le chloroforme, ont obtenu : 1^o par l'alcool, un phospho-aminolipide, analogue à la lécithine, et des acides gras ; 2^o par l'éther, des graisses neutres et une substance analogue à la cholestérine ; 3^o enfin, par le chloroforme, des cérides.

Robert Koch et Proskauer, de leur côté, ont extrait une substance insoluble dans l'alcool froid, soluble dans l'alcool bouillant, et qu'ils pensent être un acide gras non saturé. Aronson, en étudiant le résidu, après action de l'alcool potassique bouillant, y décèle un mélange constitué d'après lui d'alcool cérylique et myricique, ce qui lui laisse supposer qu'il s'agirait vraisemblablement d'une véritable cire.

Von Schweinitz et Dorset, par saponification des graisses, obtiennent des traces d'acides gras volatils et une grande quantité d'acides gras fixes, qu'ils ont pu assimiler soit à de l'acide palmitique, soit encore à l'acide arachidique, soit enfin à l'acide laurinique.

Kressling, étudiant les cendres des lipides du bacille, dont l'analyse lui a révélé une grande quantité de mélanges de graisses

neutres avec des alcools gras supérieurs, y trouve de l'acide phosphorique en notable proportion.

Ce dernier provient vraisemblablement d'une lécithine, dont presque tous les auteurs ont signalé l'existence dans le bacille tuberculeux.

Pour Baudran, il s'agirait d'une lécithine distéarique et pour Tamara d'un diaminomonophospholipide.

Frouin estime, par contre, que les substances phosphorées extraites des bacilles seraient des mélanges complexes se rapprochant des « jécoringes » et non de phosphoaminolipides chimiquement définis.

Dans cette revue rapide des travaux publiés avant les recherches de Goris sur les lipides bacillaires, il a été facile de constater combien ont été divers les résultats dans ce compartiment chimique, plus encore que dans les précédents, et ceci tant au point de vue qualitatif qu'au point de vue quantitatif.

SECTION II

Les résultats des travaux de Goris.

Goris, dans un important travail, publié en 1920, s'est attaché à préciser la nature des différentes substances lipoïdiques qu'il a extraites. Ces substances sont nombreuses :

1^o Une sorte d'éther, que Goris a dénommé hyalinol, soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther ordinaire et donnant, d'une part, de l'acide crotonique et, d'autre part, une essence à odeur agréable de mimosa ;

2^o Un mélange résinoïde, contenant différents composés, entre autres des cérides et un phosphoaminolipide (par saponification, ce mélange donne deux alcools, dont le mykol et un mélange d'acide palmitique et d'acide stéarique) ;

3^o Un céride, donnant par saponification du mykol et surtout de l'acide laurique ;

4^o Une substance fondant à 300°, obtenue en trop petite quantité pour être déterminée ;

5^o Enfin, un mélange de graisses, constitué par des glycérides des acides oléique, palmitique, stéarique, arachidique, avec un peu d'acide caproïque et d'acide butyrique.

SECTION III

Les travaux d'Anderson.

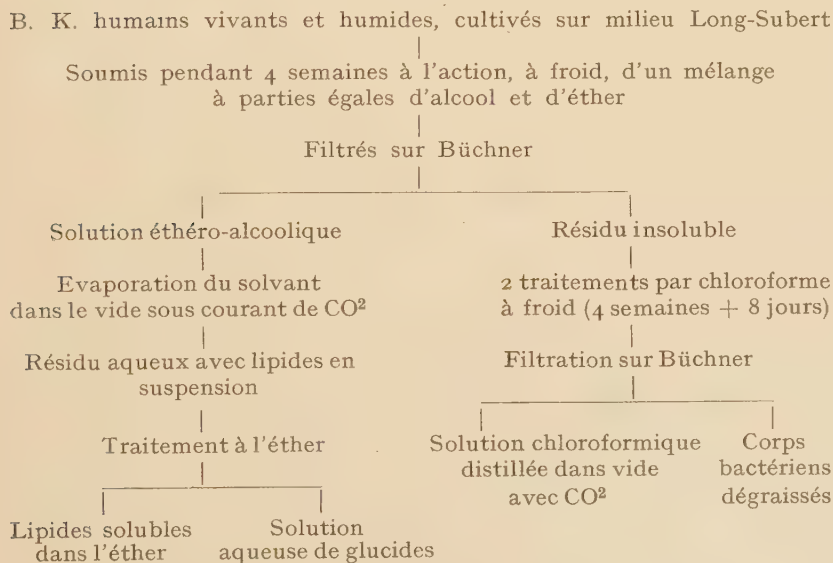
Anderson a poussé plus loin encore que Goris l'analyse de la matière grasse. Il a été continuellement guidé dans ses recherches par des essais physiologiques.

Pour éviter les dénaturations ou oxydations dues au chauffage, Anderson opère sur des bacilles tuberculeux vivants et humides, cultivés sur milieu synthétique de Long et Subert. Sur ce milieu, les bacilles contiennent 23,78% de lipides, par rapport aux bacilles secs, alors que les B. K. sur bouillon en contiennent de 38 à 40%.

Méthode d'extraction et de fractionnement d'Anderson.

Nous en résumons ici, en un tableau, les différentes opérations.

TABEAU



I. Traitement de la partie soluble dans l'éther.

L'éther est déshydraté par SO^4Na^2 , filtré, concentré, puis on ajoute un volume égal d'acétone. Il apparaît un précipité. On décante et on lave le dépôt à l'acétone.

Les liquides éthéro-acétoniques sont concentrés et précipités à nouveau par l'acétone. Il se précipite le reste des phosphatides. Anderson prétend que ces phosphatides contiennent très peu de cires.

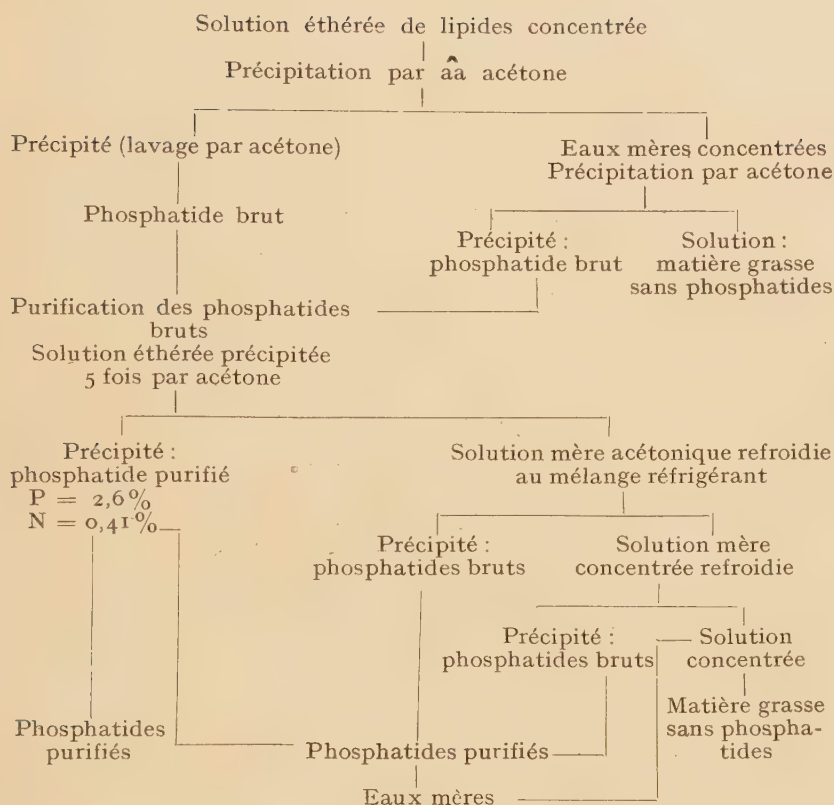
Les liqueurs mères acétoniques sont concentrées sous le vide avec CO^2 . Il reste une huile brune, se prenant en masse et qui représente la matière grasse.

A. Purification des phosphatides.

Nous en résumons les opérations dans le schéma ci-après.

Rendement. — 3.868 grammes de B. K. secs donnent :

- a) 148 gr. 5 de phosphatides purs ;
- b) 104 gr. 6 de phosphatides impurs ;
- c) 240 gr. de matière grasse.



B. Constitution des phosphatides.

Ces phosphatides représentent 27,28% des lipides totaux.

En répétant les précipitations par l'acétone, Anderson trouve P et N à des taux à peu près constants : P = 2,66% ; N = 0,41%.

Il n'ose cependant affirmer les avoir obtenus purs, car ils sont difficiles à purifier.

Après hydrolyse et séparation des acides, Anderson caractérise les acides palmitique, stéarique, oléique et, enfin, un acide

gras saturé particulier, qu'il isole par une technique spéciale et qu'il dénomme acide phtioïque brut.

Ce dernier est un liquide à pouvoir rotatoire très faible : $(\alpha)D = + 1^{\circ}50$.

Anderson et Chargaff l'ont reconnu formé de deux acides distincts séparés par distillation fractionnée des éthers méthyliques :

a) L'acide phtioïque pur, solide : $PF = + 28^{\circ}$; $\alpha D = + 7^{\circ}98$.

Sa formule serait, d'après ces auteurs, $C^{26}H^{52}O^2$ et il constituerait un isomère de l'acide hexaïosanique normal que Levène a obtenu par synthèse ($PF = 89^{\circ}$).

Il posséderait des propriétés biologiques particulières, et notamment celle de stimuler la prolifération des cellules épithélioïdes.

b) Un acide liquide, isomère de l'acide stéarique, de formule $C^{18}H^{36}O^2$, optiquement et biologiquement inactif : l'*acide tuberculostéarique*.

Anderson a retrouvé ces acides dans toutes les fractions qu'il a isolées. Bien plus, l'activité biologique de ces fractions semble être proportionnelle à leur teneur en ces acides.

Le phosphatide contient aussi des sucres.

Par hydrolyse, on obtient :

a) en milieu alcalin, des résidus gommeux solubles dans l'eau et non réducteurs ;

b) en milieu acide (SO^4H^2 à 5 %), des sucres réducteurs (35 % du phosphatide).

Anderson et Chargaff, étudiant la matière sucrée isolée de la graisse totale du B. K., constatent la présence d'un polysaccharide, déjà isolé par Anderson et Roberts et dénommé par eux « mannitoside », lequel par hydrolyse donne de l'arabinose, du mannose, du galactose et de l'inosite.

Le constituant azoté du phosphatide n'a pu être identifié par Anderson, pas plus que par Agulhon et Frouin, qui, dès 1919, avaient obtenu des conclusions identiques à celles des auteurs américains.

Ils avaient remarqué qu'en saponifiant le phosphatide, on obtenait :

- a) 37% d'acides gras totaux ;
- b) une base analogue à la choline, à chloroplatinate peu soluble, mais amorphe ;
- c) du glycérol ;
- d) une gomme précipitable par l'alcool, mais ne donnant pas de coloration par l'iode, non réductrice et présentant un pouvoir rotatoire.

Par hydrolyse, on obtenait des sucres réducteurs, donnant une osazone, qui, selon Agulhon et Frouin, serait un glucosazone.

C. Constitution de la graisse soluble dans l'acétone.

Elle représente 26% de la matière grasse totale. En raison de sa faible teneur en glycérine, Anderson pense qu'il s'agirait d'une cire plutôt que d'une graisse.

Y ont été caractérisés les acides palmitique, stéarique (en faible quantité), céiotique, linoléique (acide non saturé) et, enfin, les acides saturés particuliers : phtioïque et tuberculostéarique.

L'alcool, autre que le glycérol, n'a pu être déterminé. Toutefois, Anderson pense qu'il s'agirait d'un alcool polyatomique du groupe des glucides (ou des ites).

L'insaponifiable est un liquide huileux non analysé.

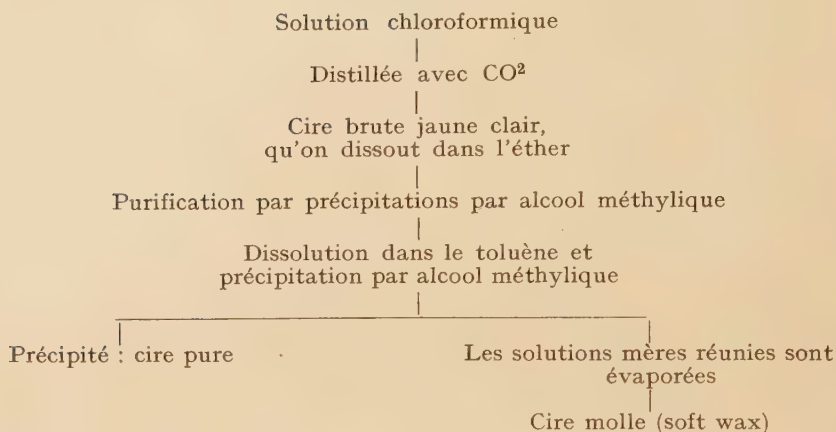
II. Traitement de la partie soluble dans le chloroforme.

Elle constitue 46,4% des graisses totales ; c'est une masse cireuse jaune clair, que l'on purifie par dissolution dans l'éther et précipitation par l'alcool méthylique.

On répète ce traitement plusieurs fois.

On dissout, finalement, dans le toluène et on précipite par l'alcool méthylique. On obtient ainsi une cire purifiée, tandis que les liqueurs mères évaporées laissent une cire molle (soft wax).

TABLEAU



A. Composition de la cire purifiée.

D'après Anderson, cette cire fond à 200-205°. Par hydrolyse acide ou alcaline, elle donne de 30 à 40% de produits solubles dans l'eau, indépendamment des savons dans le cas de saponification alcaline.

Cette fraction hydrosoluble est composée de sucres réducteurs (réaction des pentoses positive), d'un acide phosphoré, probablement glycérophosphorique, et d'un composé azoté non identifié. Tout le P et le N passent dans la solution aqueuse.

Les acides gras isolés de cette cire sont constitués par un mélange d'acides cérotique, palmitique, stéarique et d'un composé analogue à l'acide phtioïque.

Mais la plus grande partie de la cire est constituée par un composé blanc, amorphe, que l'éther extrait du milieu alcalin, et qui donne 4,2% de cendres, surtout du CO^3K^2 . L'action de HCl provoque la précipitation de KCl et le produit récupéré fixe, suivant la technique, un ou deux radicaux acétyles.

Il s'agirait donc d'un composé acide-alcool, auquel Anderson a assigné la formule $\text{C}^{94}\text{H}^{188}\text{O}^4$. Mais comme ce produit est certainement loin d'être à un degré de pureté avancé, que penser de la formule proposée ?

En résumé, la cire purifiée d'Anderson serait non une cire, mais un phosphatide complexe.

B. *Composition de la cire molle (soft wax).*

Il s'agirait de glycérides plutôt que d'une cire, ou tout au moins d'un mélange de glycérides et de cire.

Par saponification, elle donne 5,48% de glycérol et 95,6% de produits solubles dans l'éther, comprenant 70% d'acides stéarique et palmitique, d'acides gras non saturés, d'acides gras saturés optiquement et biologiquement actifs (acide phtioïque?), 13,5% d'une substance neutre odorante et 12,25% d'un insaponifiable, qui serait la cire accompagnant les glycérides gras.

En résumé, jusqu'au travail de Machebœuf, les divers chercheurs qui ont étudié les lipides bacillaires ont conclu à la présence des acides stéarique, palmitique (Goris, Anderson), linoléique (Anderson), arachidique (Goris), oléique (Goris, Anderson), butyrique, caproïque, laurique (Goris), cérotique (Anderson), hexaiosanique (Anderson, Goris et Stendal), d'acides gras saturés dextrogyres très fusibles : acide tuberculostéarique et acide phtioïque, isomère de l'acide cérotique (Anderson).

En ce qui concerne les composés alcooliques, les résultats sont contradictoires : Anderson, Goris et Stendal n'ont pas trouvé de cholestérol, contrairement aux affirmations de Kressling et de Terroine, qui en ont décelé de 0,10 à 0,20%.

Sakae Tamura et Goris croient avoir mis en évidence le mykol, mais Anderson n'a pu le retrouver.

Goris a signalé l'hyalinol, qui se dédouble en acide isocrotonique et en une huile à odeur de mimosa.

Au point de vue des phosphatides, Anderson considère qu'ils existent en assez forte proportion dans les lipides bacillaires, contrairement à Goris, qui en a trouvé en plus faible quantité.

De plus, la présence d'acide glycérophosphorique n'est pas absolument démontrée dans le phosphatide d'Anderson et le composé azoté n'a pu être caractérisé.

Conclusion.

De l'exposé des travaux précédents, qui ont porté sur les lipides bacillaires, il ressort que les résultats obtenus par les divers chercheurs ne pouvaient être considérés comme définitifs et

que de nouvelles recherches devaient être entreprises pour les compléter.

Ni la méthode de Goris, ni celle d'Anderson ne permettent une séparation nette des glycérides, des phosphatides et des cires, lesquels restent toujours plus ou moins mélangés.

Dès lors, leurs tentatives de saponification n'ont pu porter que sur des mélanges très complexes et leurs très beaux travaux ne renseignent que superficiellement sur les principes immédiats lipidiques du bacille.

C'est dans le but de combler cette lacune, en tentant d'extraire du bacille ses divers principes immédiats lipidiques, de manière à pouvoir préciser, d'abord leur nature chimique, ensuite leur activité biologique, que Machebœuf et ses collaborateurs ont entrepris, sur une matière première identique à celle de Goris, les longues et délicates recherches qui font l'objet de la section suivante.

SECTION IV

Exposé des essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoïdiques des corps bacillaires tués par la chaleur. (MACHEBŒUF. *Annales de l'Institut Pasteur*, mars 1934.)

Remarques préliminaires.

Ainsi que nous l'avons signalé précédemment, seules les fractions que nous avons pu émulsionner dans le sérum physiologique, et dont nous avons par conséquent pu mesurer le P. A., feront l'objet d'un exposé détaillé.

Il ne sera réservé, au contraire, qu'un résumé à celles pour lesquelles nos essais d'émulsion sont restés infructueux en dépit des artifices employés, et aux sous-fractions dont le pouvoir haptène ne pouvait être escompté, celui de la fraction primordiale ayant été reconnu nul ou insignifiant, et dont *l'étude sérologique devenait de ce fait inutile.*

Dans une première sous-section sont brièvement indiqués le but, la matière première, le principe de la technique d'extraction et les solvants utilisés pour l'épuisement des corps bacillaires.

La deuxième traite de l'obtention des fractions primordiales.

La troisième enfin — et ce sera la plus longue — est consacrée à l'étude de chacune de ces fractions et aux essais de leur fractionnement.

PREMIÈRE SOUS-SECTION

§ 1^{er}. — But du travail.

Michel Machebœuf et ses collaborateurs, Georgette Lévy et Norbert Fethké, se sont proposé d'extraire du bacille de Koch ses divers principes immédiats lipoïdiques, sans les dénaturer, sans les décomposer, puis de les isoler à l'état pur ou tout au moins de séparer divers ensembles constitués seulement par des mélanges de substances chimiques assez voisines pour qu'ils puissent avoir des renseignements précis sur leur nature chimique et sur leur activité biologique, le pouvoir antigène notamment.

Jusqu'à eux, les différents auteurs qui ont étudié les lipides du bacille tuberculeux ont simplement séparé quelques fractions lipoïdiques, mélanges encore très complexes qu'ils ont saponifiés pour en étudier les produits de saponification.

L'étude que Machebœuf et ses collaborateurs ont entreprise est longue et pénible. Les substances grasses ont des caractères de solubilité très voisins; leur séparation, leur fractionnement et leur purification sont dès lors très malaisés, mais la grande importance biologique et pathologique des lipides du bacille les a incités à entreprendre ce travail.

Avant d'aborder l'étude des bacilles virulents frais et vivants, dont la manipulation présente quelque danger, malgré les précautions les plus attentives, ils ont tout d'abord cherché à débayer le terrain et à poser quelques jalons en étudiant *des bacilles stérilisés*, qu'ils pouvaient trouver en grande quantité à l'Institut Pasteur, où ils sont un sous-produit de la fabrication de la tuberculine. Bien qu'ayant commencé depuis longtemps déjà l'étude des bacilles vivants, les résultats n'en seront rapportés qu'ultérieurement et ceux exposés dans cette thèse ne concernent — et il faut bien le retenir — que les substances extraites des bacilles tués par la chaleur.

§ 2. — Matière première.

Les corps bacillaires qu'ils ont étudiés proviennent, nous l'avons dit, du service de fabrication de la tuberculine de l'Institut Pasteur.

Ils sont constitués par un mélange de souches humaine et bovine (souche Vallée). Ces bacilles avaient été cultivés à 38° C. sur bouillon glycérimé pendant 4 semaines, puis stérilisés, *en présence de leur milieu de culture*, par chauffage à 120° pendant 75 minutes.

Après la stérilisation, les bacilles et leur bouillon de culture avaient été soumis pendant trois heures environ à l'air libre, à une température voisine de 100°, ceci dans le but de concentrer le bouillon. Ils étaient enfin recueillis par filtration sur papier et passés à la presse pour éliminer le plus possible le liquide (tuberculine brute) qui les imprégnait.

Il est évident que ces opérations doivent agir sur certains constituants des bacilles ; le chauffage prolongé à l'autoclave, puis à l'air libre, n'est pas sans dénaturer ou oxyder de nombreuses substances lipidiques ou autres et les résultats obtenus ne peuvent pas être tous rapprochés de ceux qu'a fournis depuis l'analyse de bacilles non chauffés.

Certaines fractions lipidiques très stables résisteraient cependant au chauffage et il semble que la matière première utilisée par Machebœuf soit une source économique de ces substances, dont il faut de grandes quantités pour l'analyse chimique.

C'est sur une matière première identique — et nous tenons à le signaler, l'examen comparatif des résultats des deux travaux devenant de ce fait plus rationnel — qu'expérimenta autrefois Goris.

§ 3. — Substances extraites.

Machebœuf et ses collaborateurs ont pu extraire des corps bacillaires, puis purifier, parfois jusqu'à un très haut degré, un certain nombre de substances intéressantes :

1° Une substance phosphorée rappelant par certains caractères les phosphatides, mais ne contenant pas de glycérol. Cette

substance, assez peu abondante dans les corps bacillaires, présente à un très haut degré la propriété — et nous avons pu la mesurer d'une manière très précise — d'être haptène, c'est-à-dire de fixer l'alexine en présence de sérums d'animaux tuberculeux ou préparés par des injections de corps bacillaires (technique de Calmette et Massol).

2° Une substance non phosphorée, alcoolosoluble, qui est un glycéride neutre très particulier.

3° Une substance blanche, non phosphorée, d'aspect cireux, de poids moléculaire très élevé, et possédant très intensément la propriété dite d'acidorésistance (technique de Ziehl-Nelsen). Cette substance, qu'ils ont pu obtenir en grande quantité et, semble-t-il, à un assez grand degré de pureté, ne se laisse décomposer qu'avec difficulté par des réactifs très énergiques tels que la potasse alcoolique bouillante. Elle représente la majeure partie des substances que jusqu'ici on dénommait « cires du bacille tuberculeux ».

4° Des substances phosphorées incolores, d'aspect résinoïde, solubles dans certains solvants des graisses et donnant par hydrolyse, d'une part, des acides gras et, d'autre part, des sucres réducteurs, parmi lesquels Machebœuf a pu mettre en évidence un pentose, qui serait vraisemblablement du xylose.

5° Enfin, ils ont remarqué que les traitements subis par les corps bacillaires au cours de la préparation de la tuberculine brute (stérilisation et chauffage à l'air) provoquaient l'apparition de certaines substances pigmentées en rouge foncé, brunâtre, substances que l'on ne trouve pas dans les bacilles frais, non chauffés. Ceci montre combien il faut se garder d'étendre aux bacilles vivants les résultats obtenus avec des bacilles tués.

§ 4. — Techniques.

1. **Lavage des corps bacillaires.** — Les corps sont lavés au moyen d'eau distillée par décantation et filtration jusqu'à ce que les eaux de lavages ne contiennent plus trace décelable de glycérol.

2. **Extraction des substances lipoïdiques.** — *Principe.* — Machebœuf a cherché à utiliser successivement divers solvants des graisses, en utilisant tout d'abord ceux qui dissolvent le moins grand nombre de substances, de façon à obtenir d'emblée, par simple dissolution, des fractions déjà nettement différenciées.

Avant de poursuivre l'extraction avec le solvant suivant, il a, avec chacun des solvants, toujours épuisé à fond, afin de ne pas laisser dans la fraction suivante des substances incomplètement extraites par le solvant précédent. Pour se rendre un compte exact du terme qu'il fallait donner aux épuisements, les extractions furent suivies pondéralement. Pour cela, les corps bacillaires étaient agités en vase clos avec un volume connu du solvant utilisé, puis, lorsque le solvant était séparé, la quantité de substance dissoute était mesurée en pesant l'extrait sec contenu dans une petite portion aliquote de la solution.

Les extractions avec chaque solvant furent renouvelées jusqu'à ce que ce dernier n'extraye plus que de très faibles quantités constantes de substances. Ces traces de substances appartiennent aux fractions extraites *ultérieurement* par les solvants appropriés et leur présence à cet échelon de l'extraction est due simplement à ce fait, qu'elles présentent vis-à-vis du solvant considéré un degré de solubilité, certes, très faible, mais réel.

Les avantages d'une telle méthode quantitative sont multiples.

Tout d'abord, lorsque cessent les épuisements par un solvant donné, il ne reste plus dans les corps bacillaires de substances appartenant à la fraction correspondant à ce solvant. Il s'ensuit que la fraction suivante obtenue par un solvant plus général des graisses ne sera pas souillée par ces substances.

Par ailleurs, la mesure de la limite de solubilité dans un solvant renseigne sur la quantité totale des substances très peu solubles dans ce solvant, qui ne devraient pas appartenir à la fraction obtenue, mais à une fraction ultérieure, et dont la dissolution de très petites quantités n'a pu se réaliser que grâce aux grands volumes du solvant utilisé.

En concentrant, suffisamment, sous le vide, les solutions obtenues, on détermine la précipitation de ces petites quantités entraînées de substances très peu solubles, ce qui permet de les éliminer assez facilement.

En appliquant ces principes, Machebœuf a obtenu dès le début des extractions, des fractions primordiales très nettement différenciées.

Il a ensuite fractionné par des méthodes appropriées chacune de ces fractions pour tenter d'obtenir des substances définies ou tout au moins assez pures pour qu'il soit possible d'avoir des renseignements précis sur la nature et la constitution chimique de ces principes immédiats.

§ 5. — Solvants utilisés pour l'épuisement des corps bacillaires.

Fractions primordiales.

Après des essais préliminaires, Machebœuf a utilisé comme premier solvant l'acétone, laquelle ne dissout pas à froid les phosphatides, ni les substances dites « cires du bacille de Koch ». L'acétone a, d'autre part, l'avantage de déshydrater rapidement les corps bacillaires et d'extraire la majeure partie des substances pigmentaires, les graisses neutres simples et les acides gras libres, tout en laissant non dissoute, même après de très nombreux épuisements, la majeure partie des substances lipodiques. Les substances dissoutes dans l'acétone constituent la *fraction acétonique*, ou *fraction A*.

Après l'action de l'acétone, les bacilles sont épuisés par de l'alcool fort (96°) chaud, lequel dissout les lipides complexes : phospholipides et phosphoaminolipides, les substances cireuses, ainsi que d'autres lipides ternaires (non phosphorés).

Par refroidissement à la glacière les solutions alcooliques laissent déposer un abondant précipité blanc de substances dites « cireuses ».

Il reste dans les solutions alcooliques mères d'assez notables quantités de substances solubles à *froid* dans l'alcool. Ces substances constituent la fraction alcoolique, *soluble à froid*, ou *fraction B*, tandis que le précipité blanc obtenu par refroidissement de l'alcool est la fraction alcoolique, *insoluble à froid*, ou *fraction C*.

Les corps bacillaires, déjà traités par l'acétone, puis par l'alcool chaud, sont ensuite épuisés par de l'éther, lequel dissout

encore quelques grammes de substances d'aspect résinoïde, qui constituent la *fraction éthérée*, ou *fraction D*.

Enfin, après tous ces épuisements successifs par l'acétone, l'alcool chaud et l'éther, les corps bacillaires contiennent encore des quantités assez notables de substances extractibles par le chloroforme. Ces dernières constituent la *fraction chloroformique*, ou *fraction E*.

Disons dès à présent, que nos recherches sérologiques n'ont porté que sur les fractions A, B, C et leurs produits de fractionnement, et non sur les fractions D et E, lesquelles, malgré les artifices successivement essayés, n'ont pu être mises en émulsion dans l'eau physiologique.

SOUS-SECTION II

Obtention des fractions primordiales.

Remarques préliminaires.

Machebœuf et ses collaborateurs ont fait un essai entièrement quantitatif, sur un kilogramme de corps bacillaires, tels qu'ils provenaient des résidus de la fabrication de la tuberculine.

Il est bien certain que cet essai ne permet pas de conclure que des résultats identiques eussent été obtenus par les mêmes procédés d'extraction avec des bacilles vivants ; les corps bacillaires étudiés contenaient, en effet, une notable quantité de glycérol et d'autres substances provenant du milieu de culture concentré dont on les avait séparés sans aucun lavage. Cet essai quantitatif ne visait donc qu'à préciser les quantités relatives des diverses fractions lipoidiques.

De nombreux autres essais de même ordre furent effectués. Bien que toutes les précautions quantitatives n'aient pas été prises aussi complètement que lors de l'essai primitif, les résultats furent toujours comparables.

§ 1^{er}. — Obtention de la fraction acétonique.

Pour obtenir cette fraction, les corps bacillaires, déjà lavés soigneusement à l'eau, sont placés dans un grand flacon avec un litre d'acétone pure. On agite, puis on laisse en contact

pendant 24 heures, en agitant le plus souvent possible. Après ce temps, le liquide surnageant ainsi que la pâte de bacilles sont versés sur un grand entonnoir de Büchner tapissé de papier Chardin. En raison de l'humidité des bacilles, la solution acétonique, transparente, jaune clair, est assez riche en eau.

Les corps bacillaires restés sur le Büchner sont remis dans le grand flacon avec un nouveau litre d'acétone pure. On pratique, comme la première fois, une séparation de l'acétone après 24 heures de contact. La solution acétonique obtenue par ce deuxième traitement est encore assez riche en eau ; elle est jaune clair comme la première.

Les bacilles sont ainsi traités 16 fois par l'acétone et l'on constate que les solutions obtenues par les troisième et quatrième traitements sont beaucoup plus colorées que celles obtenues dans les deux premiers traitements. Ceci est dû à la meilleure dissolution des graisses et pigments dans l'acétone presque anhydre que dans l'acétone hydratée au contact des bacilles humides au cours des deux premiers épuisements.

Par la suite, après cinq ou six nouveaux traitements par l'acétone, les solutions acétoniques deviennent presque incolores, bien qu'elles extrayent encore en abondance des substances lipoidiques. Les substances colorées sont donc extraites par l'acétone plus rapidement que certaines substances acétonosolubles.

Afin d'obtenir l'ensemble de la fraction, toutes les solutions acétoniques sont mélangées. Il apparaît alors un précipité, qu'on élimine par filtration. Puis elles sont évaporées dans le vide.

L'évaporation de l'acétone laisse un résidu aqueux surmonté de substances grasses et contenant en suspension fine des graisses émulsionnées.

On ajoute de l'éther et de l'eau, de manière à séparer les unes des autres, d'une part, les substances éthérosolubles, lesquelles constituent la fraction A, et, d'autre part, quelques substances hydrosolubles entraînées par l'acétone plus ou moins humide. La séparation de la phase aqueuse d'avec la phase éthérée est, en général, laborieuse, car des émulsions très persistantes apparaissent. On parvient cependant à obtenir une solution limpide, qu'on lave à l'eau plusieurs fois pour éliminer les substances hydrosolubles.

La solution éthérée est finalement évaporée à sec dans le vide ; le résidu desséché est repris par de l'éther ; on filtre la solution, que l'on évapore ensuite pour obtenir la *fraction A définitive*.

§ 2. — Fractions alcooliques B et C.

C'est sur ces deux fractions et leurs produits de fractionnement qu'a porté l'essentiel de notre travail.

Les corps bacillaires, épuisés à l'acétone, sont placés dans un grand ballon avec 3 litres d'alcool chaud. On place le tout sur un bain-marie, de façon à porter l'alcool à l'ébullition ; on filtre bouillant sur un Büchner. Ces opérations sont renouvelées, selon le principe exposé plus haut, jusqu'à ce que l'alcool bouillant ne dissolve plus que d'infimes traces de substances. Pour y parvenir, 12 épuisements à l'alcool sont nécessaires.

Les solutions alcooliques bouillantes laissent déposer par refroidissement un précipité blanc d'aspect cireux, lequel constitue la *fraction C*.

Les solutions alcooliques mères de ce précipité sont concentrées par évaporation dans le vide jusqu'à un volume de trois litres environ. Cette opération détermine la précipitation d'autres substances, autres portions de la fraction C qu'après les avoir lavées, on réunit sous le terme Cbis à la fraction C, dont elles ne sont qu'une partie dissoute dans les grands volumes d'alcool ayant servi à l'extraction de B.

L'ensemble de C, c'est-à-dire C proprement dit plus C bis, pèse 5 gr. 4 et se présente sous l'aspect d'une cire dure, blanche, très fortement acidorésistante (méthode de Ziehl).

La solution mère et les eaux de lavage sont enfin évaporées à sec dans le vide, et le résidu constitue la fraction B, qui pèse 7 gr. 05. C'est une masse graisseuse, assez dure, légèrement teintée de jaune orangé.

§ 3. — Fractions D et E.

Les corps bacillaires ainsi épuisés par l'acétone froide, puis par l'alcool chaud, sont ensuite traités longuement par de l'éther froid. Les solutions éthérées sont louches et on ne peut pas les clarifier. On les évapore, puis on reprend le résidu par du benzène ;

on filtre la solution benzénique jusqu'à limpidité absolue. Cette solution benzénique contient la fraction D, qui pèse 5 gr. 2 et se présente, après évaporation du benzène, comme une masse vitreuse, transparente, ambrée, rappelant l'aspect d'une résine très peu colorée.

Quant à la fraction E, dite fraction chloroformique, elle est extraite, en traitant les corps bacillaires successivement épuisés par les solvants précédents, au moyen de chloroforme, qui dissout lentement une substance vitreuse, dure et cassante, teintée d'ambre clair, dont l'aspect est très voisin de celui de la fraction D.

Dans le tableau n° I ci-après sont rassemblées les principales observations faites au cours de l'obtention des fractions primordiales.

SOUS-SECTION III

Etude des fractions primordiales.

Essais de fractionnement.

§ 1^{er}. — Fraction A.

Nous avons mesuré le pouvoir haptène de la fraction primordiale A. Celui-ci ayant été trouvé infime, nous n'avons pas étudié, à ce point de vue, ses sous-fractions.

Contrairement aux résultats que nous avons obtenus, Lucke puis Wadsworth et Maltaner ont prétendu que la fraction extraite par l'acétone contient une notable quantité de substances antigènes. Ils ont constaté, en effet, qu'une extraction préliminaire complète des bacilles de Koch par l'acétone — séparation des graisses, et d'après eux, des cires — diminue très sensiblement l'activité antigénique des extraits méthyliques ultérieurs. Ils en concluaient donc que le rôle des graisses et des cires n'était, à ce point de vue, nullement négligeable.

Cette contradiction n'est qu'apparente. Elle s'explique très simplement par le fait que les précédents auteurs ont dû employer pour l'extraction, non de l'acétone purifiée avec soin, mais de l'acétone contenant un peu d'alcool. Une partie des substances constituant la fraction B de Macheboëuf était de ce fait extraite

TABLEAU I

**FRACTIONS PRIMORDIALES EXTRAITES DE UN KILOGRAMME
DE CORPS BACILLAIRES HUMIDES**

Fractions	Solvant quia permis d'obtenir la fraction	Poids des fractions en grammes	Aspect des fractions	Teneur en phosphore	Observations diverses
A	Acétone	11	Masse grasseuse assez molle, très fortement teintée en rouge brun.	Nulle	Contient beaucoup de pigment, que l'on ne rencontre pas dans les bacilles non chauffés. Pou- voir haptène nul.
B	Alcool froid	7,1	Masse grasseuse assez dure, légèrement teintée en jaune orangé.	Forté	Pouvoir haptène intense. Con- tient des phosphatides et des glycérides alcoolosolubles.
C	Alcool chaud	5,4	Masse cireuse, dure, blan- che.	Très faible	Possède intensément la propriété dite « acidorésistante ».
D	Ether	5,2	Masse vitreuse, transpa- rente, légèrement ambrée.	Assez forte	Donne par hydrolyse des sucres réducteurs et d'autres subs- tances.
E	CHCl ³	1,8	Masse vitreuse, transpa- rente, légèrement ambrée.	Assez forte	Donne par hydrolyse des sucres réducteurs et d'autres subs- tances.
Poids total des fractions .		30,5			

avec l'acétone, et, par corollaire, la teneur en B des extraits méthyliques ultérieurs se trouvait être diminuée.

Par contre, Kurtmeyer puis Boquet et Nègre ont constaté que les cires et les graisses étaient, *in vivo* comme *in vitro*, de très mauvais antigènes. Pour eux, la fraction antigène fondamentale *in vitro* appartient « à la classe des phosphatides solubles dans l'alcool méthylique absolu, et insolubles dans l'acétone ». Les résultats que nous avons obtenus dans l'étude sérologique des composants de la fraction B ont vérifié, et mieux, ont précisé, ce fait. Nous verrons en effet que Machebœuf a pu isoler une substance appartenant à la fraction primordiale B — groupe des produits solubles dans l'alcool et insolubles dans l'acétone — et dans laquelle nous avons décelé un pouvoir haptène très élevé.

Aussi, l'exposé du fractionnement de la fraction primordiale A sera-t-il très bref.

Par ailleurs, elle ne présente pas non plus la propriété dite d'acidorésistance si on pratique sur elle la réaction de coloration de Ziehl-Nelsen. Les cires bacillaires, dont la fraction ϕ_2 purifiée de Machebœuf — substratum du pouvoir acidorésistant — représente la majeure partie, n'ont donc pas été séparées par l'acétone. Le pouvoir haptène décelé par Lucke, Wadsworth et Maltaner dans l'extrait acétonique, lequel, d'après eux, contient et les graisses et les cires, devrait-il alors être rattaché à ces dernières ? Nous ne le pensons pas. L'étude sérologique de la fraction C_2 ne nous permet pas — et nous le verrons d'ailleurs plus loin — de conclure dans ce sens.

Le poids de la fraction A est de 11 grammes. Elle est constituée par des graisses très pigmentées.

Par saponification alcaline, un échantillon de cette fraction donne 67,3 % d'acides gras ; 14,3 % d'un insaponifiable, incolore, éthérosoluble ; 18,4 % de substances hydrosolubles, parmi lesquelles Machebœuf et N. Fethké ont trouvé du glycérol.

La teneur totale en glycérol de la fraction A est au plus égale à 3,9 %. Une notable partie des substances hydrosolubles libérées par saponification est donc inconnue et cet inconnu représente 14,6 % des graisses. L'inconnu n'est vraisemblablement pas un sucre, le pouvoir réducteur étant insignifiant même après hydrolyse.

Machebœuf a recherché le cholestérol dans l'insaponifiable, et il a pu s'assurer qu'il n'en existait pas.

Machebœuf n'a pas poussé très en avant l'étude de la fraction acétonique, car il s'est aperçu que certaines substances de cette fraction n'existent pas dans les fractions A de bacilles *non chauffés*.

Il est cependant parvenu à extraire de la fraction A, par un fractionnement méthodique, les éthers de l'insaponifiable particulier de cette fraction et à les séparer des autres substances les accompagnant (glycérides, etc.) .

Voici les résultats du fractionnement :

Par cristallisation dans l'alcool à 96°, les substances peu solubles dans l'alcool froid, constituant la fraction A_1 , pesant 6 gr. 45, ont pu être séparées des substances très solubles dans l'alcool froid et constituant la fraction A_2 , pesant 4 gr. 47.

C'est dans la fraction A_1 que se rassemblent en majeure partie les substances libérant par saponification un insaponifiable soluble dans les solvants des graisses.

La fraction A_2 , d'autre part, est très fortement pigmentée ; elle ne se présente pas sous ce même aspect lorsqu'elle est extraite des bacilles non chauffés.

Enfin, tentant la séparation des éthers de l'insaponifiable par une série de dissolutions fractionnées dans de l'éther de pétrole léger, Machebœuf est parvenu à obtenir des substances ayant l'aspect d'une cire, qui seraient des éthers de l'insaponifiable, ce dernier paraissant, d'autre part, d'après lui, se rapprocher des stérols.

§ 2. — Etude de la fraction B ⁽¹⁾.

Les sous-fractions de la fraction B nous ont fourni la matière première la plus importante de nos recherches.

Nous verrons ultérieurement, dans la deuxième partie de cette thèse, qu'à l'exception de la sous-fraction B_1 , qu'il nous a été impossible d'émulsionner, et à laquelle, d'ailleurs, vu les résultats consignés ailleurs, on ne saurait attribuer qu'un

⁽¹⁾ Cette fraction fut plus particulièrement étudiée par M. Machebœuf, G. Lévy et J. Dieryck.

pouvoir haptène insignifiant, la valeur antigénique *in vitro* de toutes les sous-fractions de B a été mesurée :

Groupe $B_2 + B_3$;
 B_2 brute ;
 B_2 purifiée ;
 B_3a (impureté acidorésistante) ;
 B_3b (impureté phosphorée contenant de la
 fraction B_2 et d'autres substances) ;
 B_3c ou β_1 ;
 B_3d ou β_2 .

Nous verrons plus particulièrement que l'une d'entre elles, la fraction B_2 (purifiée), a un pouvoir haptène extrêmement élevé, puisqu'il est environ quatre fois et demie plus grand que celui de l'antigène de Boquet et Nègre.

Il convient donc — et les remarques précédentes le justifient largement — de faire de cette fraction une étude complète (fractionnement, purification).

A. La fraction B pèse 7 gr. 1. Elle se présente sous un aspect grassex, dur, peu pigmenté ; elle est riche en phosphore.

La fraction B est obtenue, nous l'avons vu, à l'état de solution dans deux litres environ d'alcool ; cette solution est évaporée dans le vide, puis, le résidu étant desséché avec soin, on le reprend par de l'éther. La partie restant non dissoute constitue la *fraction B₁*, pesant 1 gr. 56.

B. La solution étherée, filtrée, est évaporée à sec ; le résidu desséché pèse 5 gr. 54. Il contient encore une faible partie des substances peu solubles dans l'alcool froid, lesquelles appartiennent à la fraction C et qu'il faut tout d'abord éliminer. Ces substances, désignées par le terme fraction C bis, pèsent 2 gr. 58.

Le reste de la fraction B pèse 2 gr. 9 seulement, mais elle contient, d'une part, des substances, voisines des phosphoaminolipides, possédant, comme nous avons pu le constater, un pouvoir haptène extrêmement élevé, et, d'autre part, des glycérides très curieux, très solubles dans l'alcool ; enfin, des substances lipodiques non phosphorées, ne contenant pas de glycérol, mais d'autres polyalcools, qui, en raison de l'absence de pouvoir réducteur, ne sont pas des oses.

Pour séparer ces deux groupes de substances, Machebœuf a suivi une technique classique de la séparation des lécithines. Il a précipité les phosphatides par l'acétone.

Il a effectué méthodiquement une série de précipitations par l'acétone, et ceci lui a permis d'obtenir 0 gr. 76 de phosphatides bruts, contenant 3,33 % de phosphore, et qu'il a dénommée *fraction B₂*.

Dans les solutions acétoniques, dont les lipides complexes avaient été séparés, restaient les glycérides bruts, ou *fraction B₃*.

Les opérations pratiquées jusqu'ici sur la fraction B ont, en résumé, permis à Machebœuf d'obtenir quatre fractions brutes très différentes :

1° Une fraction dite *Cbis*, très peu soluble dans l'alcool froid, cireuse, blanche, fondant vers 70°, pauvre en phosphore (0,77%) et qui doit être rattachée à la fraction C, dont elle n'est, en somme, qu'une partie qui souillait B.

2° Une fraction B₁, très peu soluble dans l'éther et assez peu dans l'alcool, riche en phosphore, fondant vers 140°, que nous n'avons pu émulsionner dans l'eau physiologique et dont le pouvoir haptène n'a pu, de ce fait, être évalué. Cependant, en tenant compte des résultats extrêmement élevés obtenus par ailleurs sur une seule et même sous-fraction (B₂), on estime que ce pouvoir doit être inexistant ou insignifiant.

3° Une fraction B₂ de lipides complexes, de phosphatides, éthérosoluble, insoluble dans l'acétone, fondant un peu au-dessus de 140° et possédant un pouvoir haptène intense.

4° Une fraction B₃, fondant à basse température (vers 40°), très pauvre en phosphore, soluble à froid dans l'éther, dans l'alcool et dans l'acétone. Cette fraction B₃ contient des glycérides et d'autres lipides sans glycérol.

Ces quatre fractions sont très nettement différenciées. Il restait à purifier les substances principales de chacune d'elles pour pouvoir en poursuivre l'étude.

I. Etude de la fraction B₁.

Cette fraction est à peu près insoluble dans l'éther ; elle laisse, en outre, par calcination, d'assez notables quantités de cendres. Machebœuf a donc pensé qu'elle pouvait contenir des substances non lipidiques et peut-être aussi des cations combinés

à des substances grasses à caractère acide dont ils modifiaient les solubilités. Pour éliminer à la fois les substances non lipidiques et les cations, il a opéré de la manière suivante :

L'ensemble de la fraction B_1 est repris par un mélange de deux volumes d'alcool absolu et de un volume d'éther de pétrole léger : elle se dissout presque en totalité, le reste est en suspension. On place le tout dans une boule à robinet, puis on ajoute, goutte à goutte, en agitant, de l'eau acidulée par 1 pour 1.000 d'HCl. Grâce à l'alcool absolu, l'eau reste en phase unique avec l'éther de pétrole, les lipides et l'acide chlorhydrique. Ce dernier se combine aux cations qui pouvaient être liés à des fonctions acides des substances de B_1 . On verse ainsi de l'eau acidulée jusqu'à ce que la quantité d'eau soit assez forte pour que se séparent deux phases distinctes : l'une surnageante, d'éther de pétrole, qui contient les lipides débarrassés de cations, l'autre sous-jacente, hydroalcoolique, contenant des sels et des substances non lipidiques. On ajoute un peu d'eau distillée, pour mieux séparer l'éther de pétrole, qu'on libère par décantation et qu'on lave à deux reprises par de l'eau distillée légèrement alcoolisée. Il est enfin évaporé ; il ne contient plus que 0 gr. 96 de lipides purifiés, tandis que 0 gr. 6 de substances non lipidiques ont été éliminées dans les phases hydroalcooliques.

Les phases hydroalcooliques manquaient un peu de limpidité ; après les avoir agitées avec du chloroforme, pour se rendre compte s'il était encore possible d'en extraire de petites quantités de lipides, Machebœuf a pu constater que le chloroforme n'extrayait plus que d'infimes quantités de substances.

Les phases hydroalcooliques n'avaient donc pas entraîné de lipides.

La fraction B_1 ainsi purifiée se présente sous l'aspect d'une cire très dure, cassante, vitreuse, transparente, incolore, fondant à 105-107° et contenant 2,1 % de phosphore.

Par saponification, la fraction B_1 libère :

Acides gras : 70,9 % ; insaponifiable : 15,86 % ; hydrosoluble : 13,3 %.

L'hydrosoluble est constitué par de l'acide phosphorique et du glycérol, sans autre substance en quantité notable, l'acide phosphorique représentant 6,64 % de l'ensemble de la fraction B_1 , et le glycérol environ 6,5 %.

II. Etude de la fraction B₂.

Cette fraction pèse 0 gr. 76 et contient 3,33% de phosphore. Elle est très intéressante, car elle présente, d'après nos mesures, un pouvoir haptène extrêmement élevé. Nous reviendrons sur ce sujet dans la deuxième partie de cette thèse, notamment sur la mise en émulsion dans l'eau physiologique et sur l'évaluation *in vitro* de son pouvoir antigène.

Prévoyant que les phosphatides qu'elle contient avaient subi, du fait du chauffage des bacilles, quelques modifications, Machebœuf a limité son étude à un essai de purification par 10 reprises successives au chloroforme et par 10 précipitations répétées au moyen d'acétone froide, acétone contenant des traces de chlorure de magnésium, car Mac Lean avait montré l'utilité de l'ion divalent Mg pour une précipitation satisfaisante des phosphatides. Dans cette étude, il a été surpris de voir progressivement s'élever la teneur en phosphore jusqu'au chiffre considérable de 4,9%.

La substance phosphorée ainsi obtenue se présentait sous l'aspect d'une cire dure, cassante, transparente, à peine teintée de jaune-paille très clair et fondant seulement vers 145° au bloc Maquenne. Ces résultats sont assez surprenants. Il est fort possible que la substance ainsi obtenue ne soit qu'un produit d'hydrolyse ou d'oxydation des phosphoaminolipides du bacille, et il ne sera possible de conclure à ce sujet qu'après l'étude des fractions phosphoaminolipidiques que prépare, actuellement, Machebœuf à partir de bacilles frais, non chauffés. Il est à noter cependant que nous avons pu constater que la substance obtenue par cette purification présente — comme il fallait d'ailleurs s'y attendre — un pouvoir haptène extrêmement élevé, supérieur de plus de 8.000 unités à celui de la fraction brute. Les résultats sérologiques suivent donc parallèlement les résultats de l'analyse chimique.

De plus, les modifications produites par le chauffage des bacilles laissent persister ce pouvoir.

Machebœuf en a analysé une partie et il a trouvé les résultats suivants :

Phosphore : 4,9%, soit acide phosphorique : 15,5.

Azote : 1,9% environ.

Glycérol : 0.

Acide gras et traces d'insaponifiable : 67 %.

Sucres réducteurs (calculés en glucose après hydrolyse acide) : 6,25 %.

La saponification alcaline libère une substance hydrosoluble non réductrice, qui par hydrolyse acide, donne des sucres réducteurs.

On obtient directement des sucres réducteurs si l'on soumet les phosphoaminolipides eux-mêmes à une hydrolyse acide prolongée, à l'autoclave. Si l'on admet que la substance azotée inconnue et hydrosoluble libérée par hydrolyse pèse seulement cinq fois plus que l'azote qu'elle contient, on retrouve un total de 100 pour 100 pour l'ensemble des produits d'hydrolyse.

Aucune autre substance indéterminée n'est donc à rechercher dans les produits de saponification.

Etudiant le pouvoir antigène *in vivo* de cette substance phosphorée haptène, Machebœuf et C. Ninni ont obtenu, après injections à des lapins d'émulsions de cette substance seule ou mélangée à des protéides étrangers (sérum de porc), des sérums pour lesquels la réaction de déviation du complément selon la technique de Calmette et de Massol était nettement positive, mais pour lesquels la réaction de Bordet-Wassermann était également positive. Des anticorps non spécifiques étaient donc apparus. N'y aurait-il pas dans l'antigène de la réaction de Wassermann et dans cette substance phosphorée un principe chimique — élément immédiat — commun ?

Machebœuf cherche à reproduire ces expériences avec des phosphoaminolipides extraits de bacilles non chauffés, pour savoir si la spécificité antigénique existe dans ce cas.

Nous ne pensons pas que les résultats soient différents de ceux obtenus avec des bacilles chauffés. Nous avons vu que le chauffage des bacilles laisse, en dépit des modifications possibles, persister le pouvoir haptène, car le chiffre que nous avons trouvé est trop élevé pour qu'on puisse penser à sa destruction, même légère. Dès lors, à notre avis, pourquoi cet extrait phosphoré, se comporterait-il, du point de vue spécificité, différemment suivant qu'il provient de bacilles vivants ou chauffés, alors que les pouvoirs haptène et antigène, étroitement liés cependant à la spécificité, ne sont pas influencés par le chauffage.

La vérification n'en est pas moins très opportune et il y aurait même un grand intérêt à étendre, *in vivo* comme *in vitro*, cette étude comparative entre les bacilles chauffés ou vivants à nombre de fractions obtenues à partir des deux matières premières. C'est dans ce sens que nous aurions aimé poursuivre et compléter nos recherches.

III. Etude de la fraction B₃.

Cette fraction pèse 2 gr. 13. Elle fond progressivement entre 43 et 57°. Elle ne contient que 0,82 % de phosphore et ne présente qu'une acidorésistance insignifiante. Elle se présente sous l'aspect d'une masse grasseuse légèrement pigmentée en brun orangé clair. Cette fraction a été obtenue à l'état de solution dans de l'acétone refroidie à 0° ; elle contient cependant encore un peu de phosphore lipidique. Machebœuf a tout d'abord essayé d'en éliminer les impuretés phosphorées, et après divers essais, c'est encore à l'acétone qu'il a dû recourir pour réaliser cette purification. Pour cela, l'ensemble de B₃ est dissous dans le moins possible d'acétone tiède, puis la partie la moins soluble est séparée par refroidissement à 0° ; puis par une série de reprises méthodiques à l'acétone, deux impuretés différentes finissent par être éliminées de B₃ :

La première, très peu soluble dans l'acétone à 0° et peu soluble dans l'acétone tiède, pèse 0 gr. 26, fond vers 75° et contient 1,17 % de phosphore. Cette impureté est acidorésistante et représente une petite quantité des fractions C qui souillait B₃.

La deuxième, peu soluble dans l'acétone à 0°, mais nettement soluble dans l'acétone tiède, pèse seulement 93 milligrammes, mais contient 4,95 % de phosphore. Cette impureté est peut-être constituée par des produits d'hydrolyse des phosphatides. Il est très difficile d'en débarrasser complètement B₃, laquelle, après la série des purifications précédentes, contient encore 0,39 % de phosphore.

La fraction B₃ ainsi purifiée pèse 1 gr. 65.

En lui faisant subir la série d'opérations suivantes, 0 gr. 2 d'impuretés phosphorées ont pu être encore séparées :

- 1° Dessiccation absolue et reprise par l'éther anhydre.
- 2° Dissolution dans l'alcool.
- 3° Précipitation par addition d'eau.

La fraction B_3 , à ce stade de purification, pèse 1 gr. 48 et ne contient plus que 0,23 % de phosphore. Elle fond vers 32° et se présente sous l'aspect d'une graisse assez molle, très légèrement teintée d'ambre.

Pour purifier plus encore B_3 et l'obtenir rigoureusement sans phosphore, il suffirait, selon Machebœuf, de lui faire subir une série prolongée de dissolutions et de cristallisations fractionnées dans l'acétone ; mais la purification opérée est suffisante pour qu'il soit possible de préciser la nature des graisses qui constituent B_3 .

B_3 purifiée ne possède plus d'acidorésistance, ni de pouvoir haptène à la réaction de Calmette et Massol.

Par saponification, elle libère 80 % d'acides gras, du glycérol et seulement des traces insignifiantes d'un insaponifiable éthérosoluble, provenant vraisemblablement d'impuretés.

Par le fractionnement, elle fournit deux types de substances différentes :

1° Des glycérides.

2° Des éthers d'un alcool inconnu, autre que le glycérol.

Le fractionnement a été effectué de la façon suivante : Dans un volume d'éther aussi faible que possible est dissous 1 gr. 35 de B_3 ; puis la solution est refroidie à 0°. Il apparaît alors un précipité. Ce précipité est purifié par reprise à l'éther tiède et précipitation à 0°. La fraction ainsi obtenue, dénommée β_1 , pèse 446 milligrammes. Elle fond à 30-32°. Elle est constituée uniquement par des glycérides, contenant comme seules impuretés des traces de phosphore (0,22 %) et des traces d'insaponifiable éthérosoluble.

Par saponification des β_1 , on obtient 91 % de substances éthérosolubles (acides gras et traces d'insaponifiable) et des substances hydrosolubles, constituées uniquement par du glycérol.

Les solutions éthérées mères de β_1 sont concentrées légèrement puis refroidies (les dernières traces de β_1 sont ainsi éliminées) et l'on constate que les substances restées en solution dans l'éther froid constituent la fraction β_2 , ne contiennent plus de glycérol, mais donnent par saponification 80 % d'acides gras et environ 20 % de substances hydrosolubles, qui ne sont pas du glycérol, ni des sucres réducteurs. L'étude de ces substances est encore en cours.

Un fait curieux se dégage déjà des résultats acquis jusqu'ici par Machebœuf :

Le bacille de Koch utilise volontiers le glycérol comme principal aliment carboné et malgré cette affinité assez particulière pour ce dernier, les bacilles constituent la majeure partie de leurs lipides au moyen d'alcools autres que le glycérol.

Nous avons, en effet, déjà vu que les lipides de la fraction A donnent par hydrolyse moins de 4 % de glycérol et près de 15 % d'autres alcools, hydrosolubles. Nous avons vu aussi que les phosphoaminolipides de la fraction B₂ ne contenaient pas de trace de glycérol. Nous venons enfin de voir que la fraction B₃ ne contient que peu de glycérol (sous-fraction β_1). Nous verrons plus loin que les fractions C, D, E ne contiennent pas de glycérol. Dans les substances lipoïdiques totales du bacille, la quantité de glycérides est au total inférieure à 12 %.

Nos recherches sur le pouvoir haptène ont porté sur les deux sous-fractions de B₃ complètement purifiée, à savoir β_1 et β_2 .

Elles se sont étendues également aux deux impuretés séparées au cours de la purification : l'impureté rattachable à la fraction C, l'impureté constituée par des traces de B₂.

A la réaction de Calmette-Massol, la fraction B₃ ne présentait aucun pouvoir haptène. Nous avons encore pu le vérifier par l'étude de ses deux sous-fractions β_1 et β_2 , en révélant leur inaptitude totale à fixer l'alexine. Il en a été de même pour l'impureté rattachable aux fractions C.

Quant à l'impureté phosphorée éliminée de B₃ par l'acétone, elle est constituée par des traces de la fraction B₂, accompagnées par des produits voisins d'hydrolyse ou d'oxydation encore inconnus ; nous avons pu déceler sur elle un pouvoir haptène *assez faible*, égal à 1.250 unités environ, le septième de celui de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre. Ce résultat prouve bien, étant donné le pouvoir haptène extrêmement élevé de la fraction B₂ (35.800), qu'il y a d'autres impuretés inactives qui s'éliminent en même temps.

§ 3. — Etude de la fraction C.

De cette fraction C, il faut rapprocher la fraction C bis, extraite des fractions B et qui, nous l'avons dit, est une partie de C restée dissoute à froid dans l'alcool, qui contenait la fraction B.

Nous en dirons quelques mots après l'étude de la fraction C.

La fraction C pèse 5 gr. 4. Elle se présente sous l'aspect d'une masse cireuse, blanche, dure et cassante, facilement fusible en un liquide huileux transparent.

Nous avons déjà dit qu'elle possède à un très haut degré la propriété dite d'acidorésistance. Machebœuf a donc cherché à en extraire la substance qui lui confère cette propriété et à la purifier autant que possible, afin de pouvoir en étudier la nature chimique.

Cette purification fut longue et délicate, mais Machebœuf a l'impression d'être parvenu à isoler la substance acidorésistante à un degré de pureté assez avancé.

La fraction C contient seulement 0,7% environ de phosphore ; il était dès lors difficile d'admettre qu'une si faible teneur en phosphore ne soit pas due à une impureté. Machebœuf a donc pris pour contrôler et pour suivre ses opérations de purification, les deux critères suivants :

- a) Elimination des substances non acidorésistantes.
- b) Elimination des substances phosphorées.

Il s'est rapidement rendu compte que les impuretés phosphorées qu'il parvenait à éliminer n'étaient pas acidorésistantes. Il faut ajouter toutefois qu'il a eu à séparer également quelques impuretés non phosphorées et non acidorésistantes.

Certains auteurs avaient cru devoir rapporter à des phosphoaminolipides complexes le pouvoir acidorésistant du bacille tuberculeux, faisant de ces derniers le substratum du pouvoir antigène et de l'acidorésistance. Ils n'avaient sans doute pas purifié les substances qu'ils ont étudiées, car Machebœuf a pu extraire en abondance des corps bacillaires chauffés, une substance extrêmement acido et alcoolrésistante, ne contenant pas la moindre trace de phosphore, et sur laquelle nous avons constaté un pouvoir haptène nul.

Purification de la substance acidorésistante.

Machebœuf a purifié la substance acidorésistante par trois procédés différents :

- 1^o par l'alcool seul ;
- 2^o par le benzène et l'alcool ;
- 3^o par l'acétone.

Nous ne décrivons ici en détail que la purification au moyen de l'alcool seul, procédé *qui a permis l'obtention des fractions dont nous avons étudié le pouvoir haptène.*

Nous ne dirons que quelques mots de la purification par les deux autres procédés. Mais nous donnerons, puisque son récent isolement à un état de pureté assez avancé constitue un élément de documentation très récent, quelques renseignements sur les diverses propriétés physiques et la composition chimique de la substance acidorésistante.

1° *Purification par l'alcool.* — Machebœuf s'est tout d'abord rendu compte qu'il existait dans la fraction C des substances phosphorées moins solubles dans l'alcool chaud et d'autres plus solubles dans l'alcool froid que la substance acidorésistante elle-même. Il a donc basé sur ces observations un premier fractionnement par l'alcool. L'ensemble de C (5 gr. 4) est placé dans un ballon surmonté d'un réfrigérant ascendant ; on ajoute 200 cm³ d'alcool à 96°, puis on porte à l'ébullition pendant un quart d'heure. La solution alcoolique est ensuite filtrée, bouillante, par aspiration à travers un filtre en verre poreux. On remet dans le ballon, avec les substances non dissoutes, 200 cm³ d'alcool, puis on renouvelle les opérations. On pratique ainsi 5 épuisements consécutifs par l'alcool bouillant. Il reste dans le ballon et sur le filtre de verre un petit résidu très peu soluble dans l'alcool chaud, qui constitue la *fraction C₁*, pesant 0 gr. 41, dont le point de fusion est très élevé (220-225°) et la teneur en phosphore élevée (1,9%). Cette substance ne présente pas la propriété dite d'acidorésistance. Elle est voisine de celles qui constituent la fraction D, et donne, comme elles, par hydrolyse des sucres réducteurs et des substances éthérosolubles.

La substance acidorésistante s'est donc dissoute, légèrement purifiée, dans l'alcool chaud. Elle précipite par refroidissement à la température ordinaire ; on la recueille par filtration, et elle constitue la fraction C₂, pesant encore 3 gr. 67 et ne contenant déjà plus que 0,27% de phosphore. Elle fond à 50-55°.

La solubilité de la substance acidorésistante dans l'alcool à la température de 15° est faible, mais elle n'est pas nulle. Il en reste donc un peu en solution dans l'alcool. Pour récupérer cette partie, les solutions alcooliques sont refroidies à 0°, ce qui détermine la précipitation de 0 gr. 11 de substances acidorésistantes un peu

moins pures, lesquelles constituent la fraction C_3 , contenant 0,45 % de phosphore et fondant entre 45° et 52°.

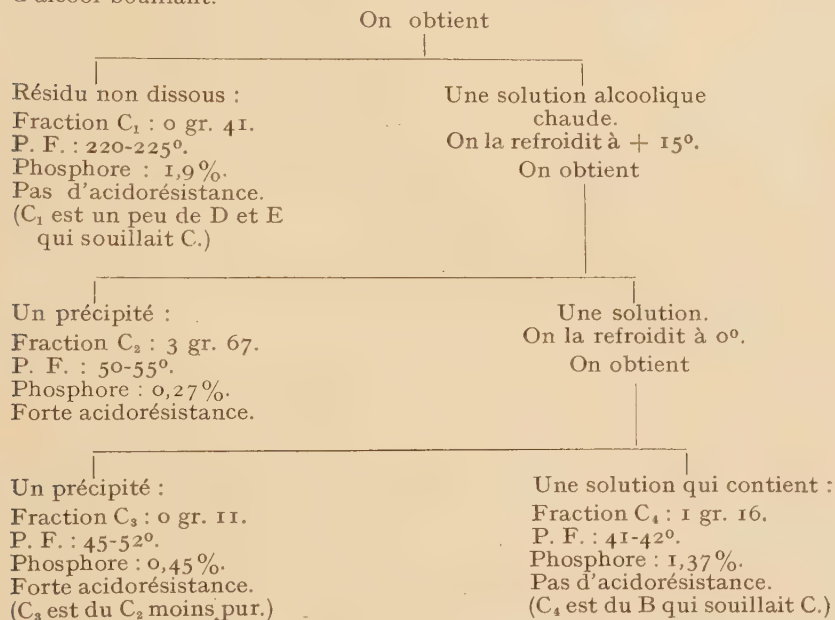
Il reste enfin en solution dans l'alcool refroidi, d'abondantes impuretés non acidorésistantes et assez notablement phosphorées, pesant 1 gr. 16, contenant 1,17 % de phosphore et fondant à 41°.

Ces substances, constituant la *fraction* C_4 , sont en somme des parties de la fraction B qui souillaient C.

Dans le tableau ci-contre sont résumés les phases et les résultats du fractionnement de C au moyen de l'alcool.

TABLEAU II

La fraction C, pesant 5 gr. 4, est traitée 5 fois consécutives par 200 cm³ d'alcool bouillant.



Les résultats de ces opérations sont très satisfaisants; la purification, toutefois, est incomplète, car il reste encore 0,27 % de phosphore dans la substance acidorésistante, constituée principalement par la fraction C_2 .

2° *Purification de C_2 par le benzène et l'alcool.* — Après différentes opérations, sur lesquelles nous ne pouvons nous étendre ici, on obtient une substance désignée sous le nom de fraction ϕ , pesant 2 gr. 07.

Elle se présente sous l'aspect d'une poudre parfaitement blanche, fondant à 45-56° et ne contenant plus que 0,15 % de phosphore (purification assez sensible, mais non encore parfaite).

3° Enfin, pour terminer la purification de Φ et lui enlever ses dernières impuretés phosphorées ou non acidorésistantes, *on fait agir l'acétone*, méthode qui s'est révélée parfaite. Elle permet d'obtenir après séparation d'une impureté phosphorée semblable ou même identique à la fraction C_1 , et plusieurs épuisements à l'acétone, la substance acidorésistante enfin privée de toutes ses impuretés phosphorées.

Cette substance acidorésistante, très purifiée, dénommée Φ_1 , a résisté aux tentatives de fractionnement. Elle semble être une substance définie, ou tout au moins, un mélange de *substances extrêmement voisines*.

Propriétés physiques et composition élémentaire.

Aspect. — Cire dure, blanche, fondant à 57-58° en une huile transparente absolument incolore.

Solubilités. — Fortes dans benzène, chloroforme, éther de pétrole. Assez fortes dans l'acétone chaude et l'alcool chaud. Très faible dans l'alcool froid. A peu près nulle dans l'acétone froide.

Poids moléculaire. — Voisin de 1.100.

Composition élémentaire. — Ne contient pas de phosphore, ni d'azote, ni de soufre. C = 80,16 % ; H = 12,73 % ; O = 7,11 %.

Acidorésistance. — Déposée en couche très mince sur une lame de verre, puis colorée à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl, elle reste encore colorée en rouge après une heure dans une solution à 25 % d'acide nitrique, puis une heure dans l'alcool.

Saponification alcaline (en milieu alcoolobenzénique). — Acides gras : 85,6 % ; insaponifiable : 10,8 % ; pas trace de glycérol.

Le total acides gras plus insaponifiable est 96,5 % ; il n'y a donc que des traces de substances hydrosolubles, dont on ne peut pas tenir compte.

Relativement à la fraction C, notre étude sur le pouvoir haptène a porté sur C_2 , C_3 , C_4 et C_4 (légèrement purifiée par une

précipitation au moyen d'acétone, à partir de sa solution chloroformique). On savait déjà que C_1 avait un pouvoir haptène nul.

D'autre part, des quatre fractions mesurées, seule C_4 — et là encore les résultats sérologiques corroborent ceux du fractionnement, puisqu'elle n'est qu'une partie de B qui souillait C — a, avec une notable intensité, fixé l'alexine, en présence du sérum antituberculeux. Son pouvoir haptène, élevé, est très nettement supérieur à celui de l'antigène de Nègre et Boquet.

Des constatations identiques auraient sans doute été faites — si nous l'avions étudiée — pour la fraction C bis, dont nous avons parlé plus haut, et qui contient surtout des impuretés solubles dans l'alcool, ce qui la rapproche incontestablement de C_4 .

Quant au pouvoir haptène des fractions C_2 , C_3 et Φ , nous n'avons pu, malgré nos nombreux essais, en constater la moindre existence.

Ainsi, comme à l'égard des graisses solubles dans l'acétone (fraction A), doit disparaître définitivement la tendance qu'ont eue Luckner, Wadsworth, Maltaner et d'autres, à attribuer, partiellement tout au moins, le pouvoir haptène du bacille aux cires, substratum exclusif, selon Machebœuf, de la propriété dite d'acidorésistance, que certains auteurs — et cela constituait un argument en faveur de cette tendance — avaient cru, par erreur, du fait de la non-purification des cérides, devoir rapporter à des phosphatides complexes.

§ 4. — Etude de la fraction D.

Cette étude sera très brève ; nous n'avons pu en effet — et il en a été de même pour la fraction E — émulsionner cette substance dans l'eau physiologique. Par ailleurs, il ne semble pas qu'on doive lui accorder, du point de vue pouvoir haptène, un rôle de première importance. Les chiffres extrêmement élevés que nous avons trouvés pour la fraction B, et plus particulièrement pour la sous-fraction B_2 , par rapport à la valeur antigénique *in vitro* de l'extrait de Boquet et Nègre, ne nous autorisent guère à envisager la fraction D. comme substratum d'un pouvoir haptène même faible et il apparaît plus rationnel de penser que le pouvoir haptène des lipides du bacille tuberculeux doit être rattaché exclusivement aux phospholipides.

La fraction est obtenue, après action sur les bacilles déjà épuisés par l'alcool et l'acétone, de l'éther, puis du benzène, qui a l'avantage de la dissoudre parfaitement. Le résidu laissé par la solution benzénique évaporée à sec se présente sous l'aspect d'une substance dure, cassante, transparente, à peine teintée d'ambre clair, rappelant en somme une collophane très pâle. Le point de fusion est peu net. Il est très élevé, un peu au-dessus de 200°. La teneur en phosphore est 0,64 %.

Traitée par le benzène et l'alcool absolu, elle donne par précipitation une sous-fraction D₁, tandis que dans les solutions alcoolobenzéniques reste la fraction D₂.

La fraction D₁ pèse 3 gr. 86. C'est une poudre blanche, à point de fusion très élevé (243-244° au bloc Maquenne), à teneur en P faible (0,66 %) et qui rappelle par certains de ses caractères la fraction qu'Anderson avait dénommée cire purifiée, avec toutefois un point de fusion supérieur de 80° à celui de celle-ci. Mais elle est loin d'être pure.

Par saponification, elle donne :

Acides gras : 12 % ; insaponifiable : 39,5 %.

Le reste est hydrosoluble, représente à peu près 49 % et est constitué en partie par des sucres réducteurs.

La méthode de Swientoslawski (détermination ébullioscopique) a permis à Machebœuf de constater que le poids moléculaire moyen des substances qui, par leur mélange, constituent D₁, atteignait un chiffre énorme (certainement supérieur à 4.000 et probablement inférieur à 5.000).

La fraction D₂ pèse 1 gr. 35. C'est une masse graisseuse, assez molle. Elle a un point de fusion beaucoup moins élevé que celui de D₁ (45°). Elle correspondrait d'après Machebœuf à ce qu'Anderson appelle « soft wax ».

La saponification alcaline en milieu benzénique donne :

Acides gras : 12 % ; insaponifiable : 73 %.

Le reste est hydrosoluble et représente environ 15 % seulement.

D₁ et D₂ diffèrent donc beaucoup par tous leurs caractères physiques et analytiques. Les points de fusion diffèrent de plus de 200°. Il en est de même pour les teneurs en insaponifiable et en hydrosolubles. D₁ notamment libère par saponification environ 50 % de substances hydrosolubles et particulièrement des oses.

§ 5. — Etude de la fraction E.

L'émulsion dans l'eau physiologique n'a pu, comme dans le cas précédent, être réalisée, et du point de vue sérologique, les observations faites dans le paragraphe 4 pourraient, dans l'ensemble, être répétées. Toutefois, le fractionnement a permis de mettre en évidence, à côté d'une substance paraissant identique à la fraction D₁, un mélange de produits très phosphorés (de 1,5 à 2,7 % de P) et à points de fusion très différents. Machebœuf incline à croire qu'il s'agirait peut-être de produit de dénaturation des phospholipides chauffés, peu solubles dans les solvants des graisses et qui se seraient rassemblés dans la fraction E, laquelle est en somme une fraction de queue. Elle constituerait, en un mot, une partie plus ou moins modifiée de B₂ souillant E. Il eût été intéressant pour nous d'en étudier l'aptitude à fixer l'alexine en présence de sérum antituberculeux. Peut-être aurions-nous trouvé des chiffres élevés, même s'il s'agit réellement de phospholipides dénaturés. Mais leur étude sérologique n'a pu être abordée, car Machebœuf les a obtenues en quantité juste suffisante pour les essais chimiques. La fraction E se présente sous l'aspect d'une masse vitreuse, transparente, dure, cassante, très légèrement ambrée. Assez riche en P (1,77 %), elle fond à 65-66°. Le fractionnement en est difficile. Par précipitations successives par addition de l'alcool à une solution éthérochloroformique de E, sont isolées diverses fractions, très différentes les unes des autres.

Bornons-nous à citer ici les substances auxquelles nous avons déjà fait allusion au début de ce paragraphe, à savoir la sous-fraction E₁, à point de fusion très élevé et à teneur en phosphore assez faible, paraissant identique à D₁, et un mélange de substances très phosphorées (de 1,5 à 2,7 %) et à points de fusion très différents (45° à 215°), provenant peut-être des produits de dénaturation des phosphatides chauffés.

Nous ne dirons rien de l'obtention de la fraction E₁. Ses principales caractéristiques, telle que Machebœuf l'a obtenue, sont :

Point de fusion : 204° au bloc Maquenne ; teneur en P : 0,77 %.

Par saponification alcaline extrêmement prolongée en milieu alcoolobenzénique, on obtient :

Hydrosoluble : 50 % environ ; acides gras : 17,6 % ; insaponifiable : 32,5 %.

Dans l'hydrosoluble se trouve une substance qui par hydrolyse donne un pentose et d'autres substances non réductrices, et encore inconnues, *mais pas de glycérol*.

SOUS-SECTION IV

Avec l'étude de la fraction E se termine l'exposé des récentes recherches de Machebœuf et de ses collaborateurs sur les substances lipidiques et lipoïdiques extraites des bacilles tuberculeux tués par la chaleur.

L'étude de l'isolement, du fractionnement et de la purification des différentes substances obtenues, nous a permis, entre autres avantages, de donner sur le pouvoir haptène de certaines d'entre elles (but essentiel de nos recherches) quelques indications, dont la présentation, peut-être prématurée, n'est pas, à notre avis, sans intérêt.

Les rapports — et nul ne saurait les nier — existant entre la constitution chimique et le pouvoir haptène, ont été ainsi plus nettement précisés, et l'exposé de nos mesures sérologiques, moins isolées de ce fait de leurs réactions chimiques, n'en sera que moins aride. Procéder différemment eût été, pour nous, d'une mauvaise méthode.

CHAPITRE III

CHOIX ET ÉTUDE DES ANTIGÈNES-ÉTALONS

Nos recherches (tentatives de chiffrage précis du pouvoir haptène des substances lipidiques du bacille) ne pouvaient présenter un intérêt véritablement réel si, parallèlement et comparativement à elles — but essentiel et même exclusif de cette investigation complémentaire — nous n'avions mesuré, à ce même point de vue, et dans des conditions d'expérience rigoureusement identiques, certains extraits bacillaires partiels ou totaux, mélanges, certes, encore complexes et loin encore d'être au stade de principes immédiats, telles les substances isolées par Machebœuf, mais qui, du fait de leur activité suffisante, sont employés couramment comme antigènes dans le diagnostic sérologique, voire dans la thérapeutique de l'infection bacillaire. Il était nécessaire, pour mieux apprécier et juger la valeur des résultats, d'avoir des points de repère ; en un mot, il convenait de choisir des étalons.

Notre choix s'est porté sur les antigènes très fréquemment employés, en France tout au moins, à savoir, d'une part, sur l'antigène à l'œuf de Besredka, suspension de bacilles dans l'eau physiologique et par conséquent antigène total, et, d'autre part, sur l'antigène méthylique de Boquet et Nègre, extrait lipidique partiel et qui, par ailleurs, dans le fractionnement des lipides bacillaires représente l'étape immédiatement antérieure aux recherches de Machebœuf. Il eût été opportun de faire porter également nos mesures comparatives sur l'extrait méthylique direct de Petroff. Nous aurions pu ainsi suivre, — et d'une manière assez précise, — par les résultats sérologiques chiffrés, toute l'évolution du fractionnement chimique des lipides, lequel a permis, au fur et à mesure qu'il était poussé plus en avant, l'obtention d'antigènes progressivement plus actifs : antigène de Petroff, antigène méthylique, fraction B₂ de Machebœuf. Mais nous n'avons pu nous procurer de cet antigène. Nous en dirons

cependant quelques mots dans ce chapitre, en nous contentant de considérations approchées.

On ne saurait nier l'utilité et l'opportunité de la mesure sérologique de substances nouvellement isolées par rapport aux ensembles plus complexes extraits antérieurement.

Indépendamment des avantages précédemment signalés, elle permet encore, — et ce n'est pas négligeable, — par le seul examen comparatif des résultats trouvés, d'une part, pour les substances — principes immédiats ou plus ou moins proches de cet état — d'une classe chimique déterminée : glucides, protides, lipides, et, d'autre part, pour les extraits moins partiels ou totaux, de préjuger, approximativement certes, quand la teneur de ces mélanges en différents éléments n'est pas connue, — ce qui est le cas le plus fréquent, — de la possibilité ou non d'existence d'un pouvoir haptène dans les éléments de la même classe chimique et dans les autres classes, qui n'ont pas, à ce point de vue, fait l'objet de mesures précises.

Il était alors opportun de réserver un chapitre à l'étude de ces antigènes classiques, étalons de nos mesures.

Nous les envisagerons plus particulièrement aux différents points de vue — et ils sont nombreux — qui touchent de près au sujet très spécial de notre thèse (relation entre la constitution chimique et le pouvoir haptène, etc.).

Nous avons divisé le présent chapitre en quatre sections.

Dans la première section est exposé l'antigène de Besredka. Nous pourrions constater, d'après les résultats que nous avons trouvés, l'influence de la nature et du nombre de ses composants sur son degré d'activité.

Dans la deuxième section sont examinés les antigènes, extraits lipidiques du bacille : l'extrait méthylique direct de Petroff et l'antigène de Boquet et Nègre.

Nous avons réuni, dans une même section, l'étude de ces deux antigènes dans le but de mieux montrer l'évolution du fractionnement des lipides tuberculeux.

Après une description sommaire de leur préparation, de laquelle, par ailleurs, nous déduirons leurs composants essentiels, et ceci parallèlement et par comparaison avec les fractions correspondantes de Machebœuf, nous donnerons les chiffres trouvés lors de la mesure de leur pouvoir haptène, comparative-ment encore à ceux trouvés pour les fractions correspondantes de

Machebœuf. Notre intention est claire : nous voulons montrer les liens existant entre la constitution chimique et le pouvoir antigène *in vitro*.

Enfin, dans la troisième section, nous traiterons de la spécificité de ces antigènes, problème qui touche de très près à notre matière.

L'étude de l'antigène méthylique sera complétée, d'autre part, par quelques indications sur son pouvoir antigène *in vivo* et sur les essais de son utilisation dans la thérapeutique de la tuberculose. Cette question intéresse notre sujet au plus haut degré. Il semble bien, en effet, d'après les expériences de Boquet et Nègre, qu'il existe un parallélisme harmonieux, sinon une relation de cause à effet, entre le pouvoir haptène, le pouvoir antigène *in vivo* et l'action thérapeutique des différents extraits tuberculeux. Tel extrait, l'extrait méthylique indirect par exemple, qui, *in vitro* comme *in vivo*, s'avère être un excellent antigène, possède également dans nombre de formes de l'infection bacillaire un pouvoir curatif et même préventif indéniable ; tel autre, au contraire, extrait acétonique direct (graisses et cires), qui se trouve n'avoir aucun pouvoir antigène, n'exerce parallèlement aucune influence retardante sur l'évolution de la tuberculose et l'accélère même.

L'état actuel de nos connaissances sur le rôle des anticorps antituberculeux rend difficile l'affirmation d'une relation de cause à effet, — action curative par formation d'anticorps, — comme, d'ailleurs, celle de l'existence d'un simple parallélisme. Mais le problème du mécanisme d'action est un problème d'une autre nature, indépendant de celui envisagé ici, et on peut se demander si la fraction B₂ purifiée de Machebœuf, qui, de toute évidence, est un composant de l'antigène méthylique et que nous avons trouvée être la seule substance lipidique possédant un pouvoir haptène, d'ailleurs très élevé, ne représenterait pas l'unique substratum du pouvoir antigène *in vivo* des extraits méthyliques et si elle ne serait pas seule à l'origine de l'action curative de ces mêmes extraits. C'est dans cette voie que Machebœuf a orienté ses recherches biologiques sur les diverses fractions qu'il a extraites. Le problème ne manque d'ailleurs pas d'importance.

SECTION I

L'antigène à l'œuf de Besredka.

L'antigène à l'œuf de Besredka est constitué par une suspension dans l'eau physiologique de bacilles tuberculeux, provenant d'une culture âgée de quatre jours, faite dans un bouillon spécial, dit bouillon à l'œuf, stérilisée à 115° et centrifugée. Il n'agit, comme nous le verrons, pas seulement comme émulsion microbienne, mais encore par sa partie liquide, qui se comporte comme un extrait.

§ 1^{er}. — Sa préparation sommaire.

1^o **Préparation du bouillon.** — On réunit dans un grand verre à pied des jaunes d'œufs auxquels on ajoute un litre d'eau distillée pure et à réaction neutre. L'émulsion est ensuite clarifiée. C'est le temps le plus délicat de la préparation, — *l'excès de soude rendant le milieu impropre à la culture*, — au moyen d'une solution de soude à 1%. Puis on complète avec de l'eau distillée, jusqu'à obtenir un liquide dans lequel le jaune se trouve dans la proportion de 1/20. Le bouillon à l'œuf est alors préparé. On le répartit en boîtes de Roux et il est stérilisé à 110° pendant 20 minutes.

2^o **Culture du bacille.** — Les bacilles tuberculeux y poussent en profondeur, sous forme de filaments blancs, extrêmement ténus. La richesse de la culture augmente rapidement, surtout si on a fait de largesensemencements. Au quatrième jour, elle est suffisamment abondante pour qu'elle puisse servir à la préparation de l'antigène. D'ailleurs, Besredka a constaté que la valeur antigénique d'une culture de bacilles dans le milieu à l'œuf diminue avec l'âge et que sa valeur la plus élevée est atteinte au quatrième jour.

La culture est tuée par chauffage à 115° pendant 30 minutes, puis centrifugée ; le culot obtenu est dilué dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique et soumis à une agitation mécanique pendant deux heures. L'émulsion mère de l'antigène est alors préparée ; on la titre et on la dilue dans quarante fois son volume d'eau physiologique pour obtenir l'antigène prêt à servir.

§ 2. — Ses composants chimiques.

Nous venons de voir que l'antigène à l'œuf de Besredka n'est, en somme, qu'une émulsion de bacilles dans l'eau physiologique. Il représente donc le bacille intégral. Il est par suite un antigène bacillaire total. Il comprend les lipides, glucides, protides et matières minérales du bacille. Par ailleurs, *le chauffage de la culture à 115°* rend vraisemblable, comme à l'égard des fractions lipidiques de Machebœuf, l'éventualité de la dénaturation ou de l'oxydation de nombreuses substances lipidiques ou autres. Dès lors, la comparaison entre l'antigène total de Besredka et les extraits partiels de Machebœuf devient possible au point de vue chimique, et par corollaire au point de vue sérologique, et cela bien que les milieux et l'âge des cultures servant à la préparation de la tuberculine et à celle de l'antigène de Besredka soient différents, la variation de la composition des milieux n'agissant qu'au point de vue quantitatif et non qualitatif. Les fractions de Machebœuf, telles que ce dernier les a isolées, doivent donc se retrouver, à des titres divers, dans l'antigène de Besredka, et leur activité ne doit pas y être changée. Nous allons voir l'intérêt que présente ce fait dans l'appréciation du pouvoir haptène de cet antigène, notamment dans la recherche approximative par déduction du ou des substratums chimiques de l'aptitude à fixer l'alexine.

§ 3. — Son pouvoir haptène.

Le pouvoir haptène que nous avons décelé sur l'antigène de Besredka s'élève à 4.200 unités. Il est donc approximativement égal à la moitié de celui (8.335) que nous avons décelé sur l'antigène de Boquet et Nègre.

Il semblerait donc bien, que l'antigène de Besredka ne doive pas uniquement son pouvoir haptène aux lipides, — à la fraction B₂ de Machebœuf, que nous savons être la seule substance parmi ces derniers possédant cette activité, — mais peut-être aussi aux glucides et aux protides, car, compte tenu des *teneurs moyennes* en protides, glucides, lipides des bacilles, le chiffre de 4.200 n'eût, de toute vraisemblance, été atteint. Le bacille tuberculeux tiendrait dès lors son pouvoir antigène *in vitro*, non seulement des lipides, mais aussi des glucides et protides, et les recherches de

Dienes et Freund, qui attribuent aux protides et à un hétéroside complexe un certain pouvoir haptène, se trouveraient — très approximativement, il est vrai — vérifiées.

Il n'en est pas moins vraisemblable également — et c'est encore le chiffre 4.200 par rapport à 8.350 qui nous le fait supposer — que l'activité des protides ou de cet hétéroside, doit être de beaucoup inférieure aux lipides et à fortiori aux extraits méthylliques indirects et à la fraction B₂ de Machebœuf.

En ce qui concerne la fixité de l'antigène, Urbain en a examiné un certain nombre d'échantillons, ayant de 15 mois à 3 ans de préparation et conservés en ampoules scellées. Il a pu constater qu'ils avaient gardé intacte leur aptitude à fixer l'alexine. Ils avaient, en outre, leur aspect habituel et ne présentaient aucun précipité en grumeaux. Ils étaient donc en tous points comparables à l'antigène à l'œuf de préparation récente.

Enfin, relativement à la partie active de l'antigène, ce même auteur et Boquet et Nègre ont remarqué, qu'immédiatement après la préparation, le liquide de l'émulsion n'a aucun pouvoir haptène, tandis que les corps bacillaires fixent énergiquement l'alexine en présence d'anticorps tuberculeux ; que progressivement les principes actifs bacillaires sont déversés dans le liquide, de telle sorte que quinze mois après la préparation, les corps bacillaires ne fixent presque plus l'alexine, alors que le liquide possède cette propriété à un haut degré. A cette période, l'antigène de Besredka se comporte donc comme un extrait et le liquide obtenu par centrifugation est plus actif que l'émulsion elle-même.

SECTION II

Les extraits lipidiques partiels du bacille tuberculeux.

SOUS-SECTION I

L'extrait méthyllique direct de Petroff.

Cet antigène est obtenu par l'action de l'alcool méthyllique sur les bacilles tuberculeux tués par la chaleur.

La comparaison de cette technique de préparation avec celle des fractionnements de Machebœuf de même que la façon dont

ses fractions primordiales se comportent à l'égard des différents solvants des graisses permettent de déduire que l'antigène méthylique de Petroff correspond vraisemblablement aux fractions B (substances lipoïdiques), A et à des traces de C (graisses et cires acidorésistantes) de cet auteur. Par contre, il ne correspond pas aux fractions D et E et ne représente, de ce fait, qu'un extrait lipidique partiel. Il ne s'agit évidemment, ici, que d'une correspondance qualitative. Nous voulons simplement dire que les fractions A, B, C doivent se retrouver dans l'antigène de Petroff telles que Machebœuf les a isolées, mais avec des proportions sans doute différentes de celles observées par cet auteur lors des épuisements successifs.

C'est là une remarque qui est générale et dont on doit tenir le plus grand compte lors de l'appréciation comparative des résultats sérologiques obtenus avec des extraits dont on connaît qualitativement mais *non quantitativement* les composés (*principes immédiats, ou mélanges complexes*).

Nous n'avons pas choisi l'extrait méthylique de Petroff comme étalon de nos mesures. Il eût été cependant très intéressant de comparer son activité à celle de l'antigène de Besredka, mais les différents auteurs qui l'ont étudié, lui ont tous reconnu un pouvoir haptène beaucoup moins élevé que celui de l'antigène de Boquet et Nègre, lequel, étant un extrait méthylique, obtenu après extraction préalable partielle par l'acétone, ne contient, de ce fait, que peu de la fraction acétonique (ou fraction A).

La faible activité de l'antigène de Petroff par rapport à celle de « Boquet et Nègre », semble donc bien confirmer encore les résultats que nous avons trouvés lors de la mesure du pouvoir haptène de la fraction A et infirmer en même temps ceux obtenus par Lucke et Maltaner et d'après lesquels un épuisement des bacilles par l'acétone diminuerait notablement l'activité antigénique *in vitro* des extraits méthyliques ultérieurs.

SOUS-SECTION II

L'antigène méthylique de Boquet et Nègre.

L'antigène méthylique est obtenu par action de l'alcool méthylique sur des bacilles tués par la chaleur et préalablement

traités par l'acétone. C'est donc un *extrait lipidique partiel bacillaire*.

§ 1^{er}. — Sa préparation.

Des bacilles humains et bovins provenant de cultures sur bouillon glycérimé, âgées de six semaines, sont stérilisés par trente minutes de chauffage à 120°, filtrés sur papier et mélangés à parties égales. Les corps bacillaires sont ensuite lavés sur le filtre à l'eau distillée, puis desséchés à l'étuve à 37° ou dans le vide.

On traite les microbes secs par de l'acétone pendant vingt-quatre heures, à la dose de 1 cm³ par centigramme de bacilles. Ils sont desséchés de nouveau et finalement mis à macérer dans l'alcool méthylique à 99° (1 cm³ par centigramme de bacilles) pendant douze jours à 37°, en ayant soin d'agiter fréquemment. Le liquide séparé par filtration du dépôt microbien constitue l'antigène tuberculeux. Il doit être employé à la dose de 1/20^e de centimètre cube, soit 1 cm³ de la dilution au 1/20^e dans l'eau physiologique.

Il fournit à froid un précipité assez abondant, qui se dépose sous la forme de petits flocons blancs. Le précipité se redissout entièrement lorsque le liquide est porté à 45-50°. Nous verrons, dans le paragraphe suivant, la conséquence qu'il convient de tirer de ce fait, au point de vue des composants chimiques de cet antigène par rapport aux fractions de Machebœuf.

Enfin, on a calculé que 1 cm³ de l'antigène de Boquet et Nègre contenait en moyenne 0 mgr. 75 de substances.

Il convenait pour nous de connaître ce chiffre. En effet, le pouvoir haptène des différentes fractions que nous avons mesurées a été calculé au milligramme de substance et non au centimètre cube de l'émulsion mère, procédé de calcul qui, dans le cas d'extraits dont le titre est *inconnu*, ne renseignerait pas sur l'activité exacte des substances dissoutes. Dès lors, pour que la comparaison des activités antigéniques décelées sur les fractions avec celles des antigènes choisis comme étalons (antigène de Boquet et Nègre) soit valable, il fallait que ces derniers fussent soumis au même mode de calcul ; ceci supposait la connaissance de leur teneur en substances dissoutes.

§ 2. — Ses composants chimiques.

La comparaison que nous allons établir entre les composants chimiques supposés de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre et certaines des fractions et sous-fractions isolées par Machebœuf fera l'objet d'un examen détaillé. Il a, en effet, parmi ses composants — et c'est l'analogie des matières premières et des procédés d'extraction respectifs qui implique cette correspondance — la fraction B et une partie des fractions A et C.

Tout d'abord, analogie des matières premières. Elles sont toutes deux constituées par un mélange de bacilles humains et bovins cultivés sur bouillon glycérimé pendant 4 semaines pour les cultures destinées à la fabrication de la tuberculine (matière première de Machebœuf) et 6 semaines pour l'antigène méthylique.

Cette différence dans l'âge des cultures ne saurait être un fossé séparant irrémédiablement les deux matières premières et rendant irrationnelle leur comparaison réciproque. Ce facteur a, certes, une influence indéniable sur la teneur des bacilles en certains principes, — et ce fait a été signalé plus d'une fois au début de cette thèse, — mais il perd singulièrement de son importance lorsque seul est envisagé le point de vue qualitatif — et ce dernier est suffisant pour l'établissement d'une comparaison.

Analogie encore entre les deux matières premières du fait du chauffage prolongé des cultures à 120°.

Analogie encore et enfin par la nature des solvants utilisés, les techniques employées et les constatations faites au cours des opérations, extraction, dans les deux cas, d'abord par l'acétone, puis par un alcool (alcool méthylique dans un cas, alcool éthylique chaud dans l'autre).

La séparation — précédant l'action de l'acétone — de la tuberculine des bacilles, matières premières de Machebœuf, ne doit pas être retenue comme fait s'opposant à notre comparaison, puisque nous savons que la tuberculine appartient au bloc des protides et qu'elle est, par conséquent, insoluble dans l'acétone et l'alcool.

Quant aux différences dans le détail des deux techniques (épuisement à fond lors de l'extraction de chaque fraction dans les recherches de Machebœuf, température à laquelle ce dernier a fait agir l'alcool sur les bacilles préalablement traités par l'acé-

tone), il est certain qu'elles ne peuvent manquer d'exercer une influence sur les résultats.

Ainsi, contrairement à la fraction B, l'antigène méthylique contient certainement, du fait du non-épuisement complet par l'acétone, en quantité notable certaines des substances constituant la fraction A de Machebœuf (graisses).

D'autre part, la faible température (de 37°) à laquelle agit l'alcool dans la préparation de l'antigène méthylique ne permet sans doute pas, toutes choses égales d'ailleurs, l'extraction intégrale des cires acidorésistantes, comme a pu la réaliser Machebœuf par ses épuisements successifs et en portant l'alcool éthylique à la température de l'ébullition, bien que la durée du séjour à l'étuve (12 jours) soit susceptible de compenser, légèrement tout au moins, la température. Mais la solidité de notre comparaison ne saurait s'en trouver ébranlée, le point de vue qualitatif n'en étant, à peu de chose près, nullement influencé. Enfin, l'abondant précipité blanc que fournit à froid l'antigène méthylique, et qui se redissout entièrement lorsque le liquide est porté à 45-50°, n'apporte-t-il pas une nouvelle preuve que certaines substances de la fraction C de Machebœuf existent dans l'extrait de Boquet et Nègre ?

Les considérations précédentes nous permettent donc de conclure qu'une correspondance qualitative certaine existe au point de vue chimique entre l'antigène méthylique et les fractions B et C de Machebœuf, fractions extraites, nous l'avons vu, par l'alcool éthylique, auquel, par ailleurs, on reconnaît à l'égard des lipides un pouvoir dissolvant assez semblable à celui de l'alcool méthylique.

Il ne s'agit là — et nous le répétons encore, car une fausse interprétation du but recherché en établissant ces correspondances risquerait de ne point faire saisir tout l'intérêt de ce présent chapitre — que d'une comparaison qualitative.

§ 3. — Son pouvoir haptène.

Le pouvoir haptène de l'antigène méthylique a atteint lors de nos mesures le chiffre de 8.350 unités. Ce chiffre s'entend évidemment du pouvoir haptène d'un milligramme du résidu de l'évaporation sous le vide de l'antigène, et non du pouvoir haptène d'un centimètre cube de l'extrait méthylique proprement

dit. Ce calcul au milligramme de substances dissoutes s'imposait, car, outre que le titrage au centimètre cube ne renseigne pas d'une manière précise sur l'activité des principes dissous, leurs proportions étant susceptibles de varier avec les techniques de préparation, le choix de cet antigène comme *étalon* de nos mesures n'aurait pu, d'autre part, se justifier, si nous en avions déterminé l'activité sur une base autre que celle sur laquelle étaient réalisées ces mesures elles-mêmes.

Enfin, si l'on connaît l'activité antigénique de chacun des composants d'un extrait, on peut, quand on calcule au milligramme, se faire une idée, au moins approximative, de sa teneur en ces divers principes.

Le pouvoir haptène de l'antigène méthylque est inférieur de $35.750 - 8.350 = 27.400$ unités à celui de la fraction B_2 purifiée de Machebœuf. Par rapport à cette dernière, il est approximativement 4,3 fois plus faible, ce qui, d'ailleurs, n'est point surprenant, puisque nous savons que parmi les principes qui vraisemblablement le composent, seule la fraction B_2 , phospholipide sans glycérol, s'est révélée à un haut degré haptène.

D'autre part, si l'on compare l'activité *in vitro* de l'extrait de Boquet et Nègre à celle — égale à 12.500 unités — que nous avons décelée sur le mélange $B_2 + B_3$, on constate que ce dernier n'est supérieur au premier que de 4.150 unités (1,50 fois plus élevé). On peut en conclure que la teneur de l'antigène méthylque en substances des fractions A et C, que nous savons être inactives, ou presque, est sans doute relativement faible, l'activité de la fraction B totale devant être à elle seule nettement inférieure à 12.500, du fait de la présence de la sous-fraction B_1 , inactive.

Enfin, rappelons, pour terminer, que l'antigène de Besredka est inférieur de 4.150 unités à celui de Boquet et Nègre. Nous avons vu, plus haut, les conclusions qu'il convenait de tirer de ce résultat.

§ 4. — Le pouvoir antigène *in vivo* de l'extrait méthylque de Boquet et Nègre.

Nous avons signalé, au début de ce chapitre, qu'il y avait, d'après les recherches de Boquet et Nègre, un parallélisme indéniable entre le pouvoir haptène, le pouvoir antigène *in vivo* et

l'influence thérapeutique exercée sur certaines formes de l'infection bacillaire des différents extraits partiels tuberculeux (graisses, substances lipœdiques, cires, etc.).

Or, parmi les substances lipidiques et lipœdiques, seul un phospholipide, assez particulier, du fait de l'absence de glycérol, la fraction B₂ de Machebœuf, présente *in vitro* un pouvoir antigénique, d'ailleurs très élevé. On est ainsi conduit à se demander si ce même principe ne serait peut-être pas également l'unique substratum du pouvoir antigénique *in vivo* décelé sur leur extrait méthylique par Boquet et Nègre, comme il ne serait pas, par ailleurs, seul à l'origine de l'action thérapeutique de ce même extrait.

Nous verrons dans le paragraphe suivant les résultats observés dans la tuberculose expérimentale des animaux de laboratoire et dans la tuberculose humaine à la suite d'injections de l'antigène de Boquet et Nègre, et les conclusions qu'il convient d'en tirer relativement à l'action possible de la fraction B₂ de Machebœuf.

Quant au pouvoir antigène *in vivo* des différentes fractions isolées récemment par ce dernier auteur, il fait, à l'heure actuelle, l'objet de nouvelles recherches. Les résultats n'en sont pas encore connus, mais il est vraisemblable qu'ils seront pour les principes immédiats ou près de ce stade, ce qu'ont été ceux de Boquet et Nègre à l'égard de mélanges plus complexes (graisses, cires, extrait méthylique).

Ces auteurs, après avoir montré les propriétés fixatrices des substances lipœdiques bacillaires de leur extrait méthylique, ont recherché si ces mêmes substances, fixant l'alexine en présence d'un sérum antituberculeux, manifestaient *in vivo* le même pouvoir antigénique.

Pour les rendre injectables, ils ont préparé des émulsions aqueuses (dans le sérum physiologique). Celles-ci correspondent à un centigramme de corps microbiens desséchés, c'est-à-dire à 5 centigrammes de corps microbiens frais par centimètre cube.

1^o Injecté quatre fois tous les deux jours à des lapins neufs par la voie veineuse à la dose de 2 à 3 cm³, elle provoque une abondante formation d'anticorps, mis en évidence par la réaction de Bordet-Gengou avec l'extrait méthylique correspondant. Le titre de la sensibilisatrice atteint neuf jours après la dernière injection 60 à 100 unités de Calmette-Massol chez les lapins neufs

et jusqu'à 1.200 unités, au lieu de 20 avant les injections, chez les lapins tuberculeux.

2° Ces résultats ont été confirmés chez des enfants tuberculeux par Armand-Delille (1926) et chez des malades atteints d'adénite bacillaire par Courcoux et Bidermann (1926). Ce dernier, notamment, a constaté une abondante formation d'anticorps chez des malades traités par l'antigène méthylique. De nul ou faible qu'il était avant le traitement, leur taux s'est élevé au cours de ce dernier à 100, 200, 300 unités, et même davantage. Ces faits semblent donc bien prouver que l'antigène méthylique possède, *in vivo* comme *in vitro*, un pouvoir antigénique très net.

Les graisses. (fraction A) et les cires que Boquet et Nègre ont extraites par l'acétone, ont fait, de la part de ces mêmes auteurs, l'objet de recherches identiques, mais elles se sont révélées inaptes à la production d'anticorps *in vivo*. Les résultats obtenus dans ces deux séries de recherches plaident évidemment en faveur du parallélisme existant entre le pouvoir haptène et le pouvoir antigène *in vivo*, et sur lequel nous avons tant insisté précédemment. Si elles ne prouvent pas que ces différents extraits partiels bacillaires présentent, *in vivo* comme *in vitro*, un pouvoir antigène de même intensité, — ce qui ne rentrait d'ailleurs pas dans les points essentiels à déterminer, — elles permettent de conclure que seules les substances possédant cette aptitude *in vitro*, la manifestent *in vivo*, et c'est là un résultat déjà très appréciable.

Ces recherches effectuées sur des mélanges encore complexes, il convenait de les compléter et de les préciser par l'étude sérologique des principes immédiats ou proches de cet état, dès que les fractionnements et l'analyse chimique permettraient de les isoler et de les définir ; c'est la première partie de cette étude biologique, — celle du pouvoir haptène, — destinée à reporter dans un cercle chimique plus étroit le pouvoir antigénique du bacille, que, à la suite des fractionnements récents de Machebœuf, nous avons tenté de réaliser. Nous en connaissons déjà, dans l'ensemble, les résultats.

Quant à l'étude du pouvoir antigène *in vivo* et de l'action thérapeutique, des recherches, sur ce point, ont été entreprises, depuis longtemps déjà, par Machebœuf. Elles se poursuivent actuellement.

§ 5. — L'antigène méthylique dans la thérapeutique de la tuberculose.

Il n'existe actuellement aucun sérum antimicrobien ou antitoxique susceptible de détruire *in vivo* le bacille de Koch. Nous ne pouvons, par conséquent, opposer à la tuberculose aucun moyen thérapeutique comparable, soit aux sérums de la diphtérie, du tétanos, des gangrènes gazeuses ou de la peste, soit aux composés organiques arsenicaux, si efficaces contre la syphilis et les trypanosomiasés, ou à la quinine, employée, avec beaucoup de succès, dans le traitement des affections paludéennes.

Mais, en l'absence de sérum ou d'un produit chimique spécifique, on peut envisager la lutte non plus directe, mais indirecte contre le bacille, par l'intermédiaire des cellules défensives ou des humeurs de l'organisme au moyen de certaines substances fabriquées par le bacille lui-même dans les milieux de culture artificiels ou dans l'organisme animal et humain — nous voulons parler des tuberculines, *des divers antigènes partiels extraits des corps microbiens* et des corps microbiens eux-mêmes préalablement tués par les divers agents physiques et chimiques. Les recherches ont donc été aiguillées vers la mise au point d'une méthode vaccinothérapique. Des résultats encourageants ont été obtenus, mais jusqu'ici aucune n'a encore fait véritablement et entièrement ses épreuves. Les essais thérapeutiques des corps microbiens, tués, virulents ou de virulence atténuée, comme d'ailleurs celui des extraits d'organes sains ou tuberculeux, n'ont point donné des résultats dignes d'être retenus.

Par contre, ceux des différents extraits partiels du bacille ont permis de constater que les substances lipoidiques solubles dans l'alcool et insolubles dans l'acétone, composants essentiels de l'antigène méthylique (fraction B de Machebœuf) et que nous savons, d'autre part, être parmi les lipides le seul groupe de substances possédant, *in vivo* comme *in vitro*, un pouvoir antigène élevé, exerçait une influence très nettement bienfaisante sur l'évolution de diverses formes de l'infection bacillaire et qu'au contraire, les autres extraits partiels (tuberculine, graisses et cires, protéines) ne manifestaient qu'une action thérapeutique, nulle pour certains, négative pour d'autres.

C'est à Boquet et Nègre que revient l'honneur d'avoir mis ces faits en évidence. Contrairement aux conclusions des recherches de Deycke et Much, lesquels estiment que l'immunité réelle, complète, ne peut être obtenue que par la mise en œuvre de tous les antigènes partiels, — d'après eux, albumine, lipoïde, graisse, — Boquet et Nègre semblent avoir démontré que les différents antigènes partiels extraits des bacilles par les divers solvants se comportent différemment tant au point de vue du pouvoir antigène qu'à celui de l'influence qu'ils exercent sur l'évolution de la tuberculose expérimentale des petits animaux de laboratoire et, qu'au surplus, il y aurait, pour un extrait donné, un parallélisme évident entre son pouvoir haptène, son aptitude à provoquer *in vivo* la formation d'anticorps et son action thérapeutique. C'est évidemment là un fait que ces auteurs ne pouvaient manquer de signaler, et ceci d'autant plus qu'ils furent précisément et logiquement amenés à rechercher dans quelle mesure l'antigène méthylique modifie l'évolution de la tuberculose expérimentale et à comparer son action avec celle des autres constituants du bacille, à la suite de la constatation, lors de l'étude du pouvoir antigène *in vivo* chez des lapins tuberculeux des extraits alcooliques bacillaires, de la survie, pendant plusieurs semaines et même plusieurs mois par rapport aux témoins, des animaux soumis à des injections répétées de cet antigène partiel.

Ces considérations générales étant faites, il convient maintenant d'exposer brièvement, d'après les travaux de Boquet et Nègre, l'action thérapeutique de l'antigène méthylique, d'abord dans la tuberculose expérimentale des animaux de laboratoire, ensuite dans la tuberculose humaine, à laquelle il est appliqué grâce aux résultats très encourageants que l'expérimentation sur l'animal a permis d'obtenir.

A. L'antigène méthylique dans le traitement de la tuberculose expérimentale des petits animaux de laboratoire.

1^o *Chez le lapin.* — Plusieurs lots de lapins sont infectés par injection intraveineuse de 0 mgr. 001 de bacilles tuberculeux bovins. Ils sont ensuite traités par des injections sous-cutanées de 1 cm³ d'extrait méthylique, à raison de une ou deux injections par semaine. La plupart de ces animaux ont survécu de 5 à 6 mois

aux témoins. Certains même ont résisté jusqu'à 7 et 10 mois après l'inoculation virulente.

D'autre part, les témoins sont morts cachectiques en deux ou trois mois, avec des lésions confluentes et généralisées, alors que les animaux traités se sont maintenus en bon état jusqu'aux dernières périodes de leur maladie. A l'autopsie, ces derniers ne présentaient que des tubercules isolés dans les poumons et les autres organes n'étaient qu'exceptionnellement atteints. L'examen histologique a de plus révélé chez ceux dont la survie avait été longue la sclérose cicatricielle des lésions pulmonaires et rénales. Ce résultat, qui a été également constaté chez l'homme par Armand-Delille à l'autopsie de malades traités par l'antigène méthylique, est d'autant plus intéressant que la sclérose spontanée des lésions pulmonaires du lapin n'a jamais été observée.

2° *Chez le cobaye.* — Des lots de cobayes sont infectés par instillation oculaire de 0 mgr. 5 de bacilles bovins, puis ils sont traités par des injections intrapéritonéales de 0 cm³ 5 d'antigène.

La plupart ont, comme chez le lapin, survécu de 1 à 5 mois aux témoins et se sont maintenus en bon état jusqu'aux dernières périodes de la maladie.

A l'autopsie, les lésions étaient dans la moitié des cas limitées aux ganglions lymphatiques et à la rate.

Boquet et Nègre ont, d'autre part, comparé l'action des substances lipoidiques de l'antigène méthylique avec celle des autres extraits partiels du bacille. Dans ce but, ils ont traité en même temps plusieurs lots d'animaux infectés le même jour et dans les mêmes conditions respectivement avec l'extrait acétonique direct des bacilles de Koch (graisses et cires) (fractions A et C de Machebœuf), avec les corps bacillaires dégraissés par l'alcool méthylique (protides) et avec une solution de tuberculine brute au 1/100^e dans l'huile d'olive stérile.

Nous savons déjà que les graisses (fraction A) et les cires (fraction C) n'ont, *in vitro* et *in vivo*, aucun pouvoir antigène et que les protides et la tuberculine manifestent cette aptitude, mais avec une intensité très peu marquée.

Nous allons voir que leur action thérapeutique est à peu près parallèle à leur activité antigénique.

La tuberculine et les corps bacillaires dégraissés n'ont exercé aucune influence sur l'évolution de la tuberculose des animaux de

laboratoire, lesquels sont morts dans les mêmes délais et avec les mêmes lésions que les témoins. Le résultat est nul, mais non négatif. L'aptitude thérapeutique, parallèle au pouvoir antigène, que l'on sait *peu marqué*, doit être trop faible pour que ses effets puissent être nettement perceptibles.

Au contraire, les graisses et les cires (fractions A et C) ont accéléré l'extension des lésions à tous les organes, et il suffit que l'extraction préalable des graisses et des cires par l'acétone soit insuffisante lors de la préparation de l'antigène méthylique, pour que ses effets thérapeutiques deviennent nuls.

Dès lors, seuls les extraits méthyliques des bacilles préalablement traités par l'acétone tiède (fraction B de Macheboëuf, accompagnée très vraisemblablement par certaines substances des fractions A et C de ce même auteur, en raison du non-épuisement intégral par l'acétone) et les extraits éthérés (fractions B et D) correspondants ont une action thérapeutique positive (influence retardant l'évolution de la tuberculose expérimentale). Les extraits éthérés seraient moins actifs que les extraits méthyliques, ce qui serait encore une nouvelle preuve du parallélisme existant entre le pouvoir antigène et l'action thérapeutique, puisque les extraits éthérés sont composés, outre la fraction B, de la fraction D, que nous savons ne pas avoir de pouvoir haptène.

Il faut ajouter que les extraits méthyliques et éthérés, non seulement circonscrivent et ralentissent la tuberculose expérimentale, mais encore la préviennent très nettement, lorsqu'ils sont injectés avant l'épreuve virulente. Les lapins ainsi traités survivent en effet plusieurs mois aux témoins, et si on les sacrifie trois mois après l'épreuve virulente, on ne constate à l'autopsie que des lésions peu étendues, généralement pulmonaires.

Enfin, innocuité chez les animaux tuberculeux, pas de sensibilisation chez les neufs, absence complète de toxicité, à l'inverse de la tuberculine, et, ainsi que Guinard, Courcoux et Bidermann l'ont constaté chez l'homme, aucune accoutumance à la tuberculine.

Les recherches de Boquet et Nègre ayant révélé l'innocuité des extraits méthyliques chez les animaux tuberculeux et montré leur influence sur l'évolution de la tuberculose expérimentale, leur emploi a été étendu au traitement de la tuberculose humaine.

B. L'antigène méthylique dans la thérapeutique de la tuberculose humaine.

Les résultats obtenus dans la tuberculose pulmonaire, les adénites bacillaires et les tuberculoses cutanées ont été très encourageants.

Dans la plupart des cas, l'antigène méthylique s'est montré d'une innocuité absolue, donc plus facilement maniable que la tuberculine, à la condition toutefois de l'inoculer, comme pour cette dernière, par doses progressivement croissantes.

1^o *Action sur les tuberculoses externes et chirurgicales.* — Les praticiens — et ils sont nombreux (Béthoux, Jacob, Bidermann, Isaac) — qui l'ont essayé dans ces formes de tuberculose, affirment tous qu'il agit sur elles d'une façon remarquable. Dans les tuberculoses cutanées, l'action paraît surtout s'exercer sur les lésions à tendance ulcéreuse ou végétante. Cependant, Khalis et Djabry, dans le service du professeur Oltramare, à Genève, ont observé la guérison complète en trois mois de deux lupus érythémateux de la face. Guinard, Magitot et Caboche ont signalé, d'autre part, l'efficacité de l'antigène méthylique sur les lésions des muqueuses nasale, gingivale et laryngée.

2^o *Action sur les tuberculoses ganglionnaires.* — Courcoux et Bidermann, puis Léon Bernard et Valtis ont employé l'antigène méthylique dans le traitement des tuberculoses ganglionnaires. Ils ont pu constater que sous son influence, la péri-adénite disparaît rapidement, et que, s'il lui est impossible de modifier les adénites sclérosées et calcifiées, — ce qui, d'ailleurs, ne saurait surprendre, — il agit efficacement sur les adénites récentes, qu'il fait régresser presque toujours. Sous son action, la suppuration se ralentit, les fistules se cicatrisent, puis les ganglions finissent par se résorber ou ne sont plus représentés que par un nodule fibreux.

Ces résultats ont été confirmés ; ils sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été observés dans un grand nombre de cas où les thérapeutiques usuelles avaient échoué.

3^o Sur les ostéites et arthrites bacillaires, l'action de l'antigène méthylique est comparable à celle qu'il exerce sur les

tuberculeuses ganglionnaires : on observe la résorption des abcès, la cicatrisation des fistules et des plaies. C'est ainsi que des arthrites du genou ont été guéries sans immobilisation dans le plâtre, uniquement par des injections d'antigène.

4° Des résultats également très favorables ont été obtenus dans les péritonites bacillaires et dans les tuberculeuses testiculaires, intestinales, rénales et oculaires.

5° Enfin, l'antigène méthylique a été appliqué au traitement de la tuberculose pulmonaire. De très nombreux essais ont été faits, et il semble possible de conclure, bien qu'il soit difficile de juger son effet sur cette localisation, ce traitement devant être prolongé pendant de nombreux mois pour manifester son influence, que les extraits méthyliques ne sont pas dépourvus de toute action sur la tuberculose pulmonaire.

Ce sont les formes torpides, progressant lentement, les formes fibrocaséuses et ulcérocaséuses, à tendance évolutive, et la tuberculose pulmonaire à son début, qui sont les plus justiciables de l'antigénothérapie par les extraits méthyliques, et dans ces cas, il est exceptionnel d'observer des réactions générales à la suite des injections, si ces dernières sont progressivement croissantes.

Au contraire, le traitement par l'antigène méthylique n'est pas à instituer dans les tuberculeuses évolutives, dans les cas de lésions anciennes et étendues avec spélunques et chez tous les congestifs qui ont présenté des hémoptysies graves.

D'une manière générale, l'opinion de ceux qui ont appliqué l'antigène méthylique au traitement de la tuberculose pulmonaire est que l'état général des malades en est très favorablement influencé : l'appétit réapparaît, le malade reprend des forces et le poids augmente régulièrement.

Après les nombreux essais qu'il a faits au sanatorium de Bligny, Guinard estime que dans la tuberculose pulmonaire, l'antigène méthylique agit en ralentissant très nettement, voire en arrêtant l'évolution de la maladie. Il assécherait les foyers, stabiliserait les lésions tuberculeuses et en assurerait la réparation par un processus de sclérose.

Enfin, de nombreux cliniciens ont signalé la diminution et souvent même la disparition complète de la toux et des expectorations.

L'antigène méthylique serait donc susceptible d'agir aussi très favorablement sur les lésions pulmonaires de l'homme, les lésions récentes principalement, comme il agit sur la tuberculose pulmonaire des petits animaux de laboratoire, mais à la condition que le traitement soit prolongé pendant longtemps.

« Dans l'état actuel de nos connaissances, dit le professeur Calmette, il semble bien que l'antigène méthylique est le produit qui peut donner avec les plus grandes garanties de sécurité, le maximum d'effets utiles. Son action est prouvée par les expériences de traitement qui ont été faites chez les animaux de laboratoire et par les résultats obtenus dans les tuberculoses externes. L'avenir nous fixera sur ce qu'on peut attendre de lui dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. »

A la suite de ses fractionnements qui lui ont permis d'isoler les principes immédiats, ou presque, dont est composé le mélange complexe que représente l'antigène méthylique, Machebœuf s'est proposé de rechercher de quelle manière chacun de ses composants se comporte à l'égard des lésions tuberculeuses, s'il en accélère ou en retarde l'évolution, afin que soit définitivement déterminé le substratum de l'activité thérapeutique de l'antigène, comme est déjà précisé celui de son activité antigénique, et que ses composants à effets nuls ou négatifs soient écartés. Comme nous le savons déjà, ces recherches ont été entreprises et se poursuivent activement.

Il était judicieux de les diriger dans cette voie.

Boquet et Nègre, travaillant sur des mélanges complexes : graisses, cires, substances lipoïdiques, protides, ont nettement montré le parallélisme existant entre le pouvoir antigène et l'action thérapeutique.

Des résultats de cette nature permettent évidemment de penser que, peut-être, à l'investigation approfondie — celle portant sur les éléments immédiats — cette même constatation sera faite.

Or, nous avons vu que l'antigène méthylique est composé essentiellement par les sous-fractions B₁, B₂ et B₃ de Machebœuf et qu'au surplus, — et en raison du non-épuisement intégral par l'acétone tiède des cires et des graisses, — il est très vraisemblablement souillé par certaines substances de la fraction A et par de la fraction C, dont l'existence dans l'antigène est révélée par le précipité blanc s'y produisant à froid.

Nous savons, d'autre part, que parmi tous les composants, *seule* la fraction B₂ manifeste *in vitro* un pouvoir haptène, d'ailleurs très élevé.

Dans ces conditions, si le parallélisme visé précédemment existe à l'égard des éléments immédiats, ne serait-il pas opportun d'écarter de l'application thérapeutique, outre les substances appartenant à A et C, et dont nous connaissons l'action favorisante sur l'évolution de la tuberculose, les sous-fractions B₁ et B₃, dont les effets, vraisemblablement nuls, peut-être même négatifs, ne pourraient que gêner et entraver l'action de l'antigène méthylique, pour n'utiliser que la sous-fraction B₂, qui serait ainsi le substratum de son activité thérapeutique.

Il n'y a là qu'une hypothèse, mais une hypothèse reposant sur des bases solides. Les recherches biologiques de Machebœuf permettront peut-être de conclure.

SECTION III

La spécificité des antigènes tuberculeux.

C'est certainement dans l'étude de la spécificité des antigènes que l'existence des liens très intimes unissant la constitution chimique et le pouvoir antigène — deux points de vue que, dans cette thèse, nous n'avons jamais séparés — apparaît la plus évidente.

Là encore — et c'est la conséquence de cette connexité — se révèle la fragilité de cette notion, telle qu'on la conçoit habituellement.

La plupart des antigènes, en effet, ne sont pas à proprement parler des antigènes uniques, nettement définis et différenciés, mais, au contraire, chacun d'eux représente un mélange chimique complexe, une « mosaïque » de substances, dont certains éléments peuvent être — et cela se conçoit — communs à des antigènes d'origine très différente : bacille tuberculeux et bacille de la diphtérie, par exemple. De là l'explication des défaillances de la spécificité.

On peut citer dans ce sens l'exemple classique de l'antigène commun de Forssmann. Mais bien d'autres exemples pourraient être donnés, et en matière d'antigènes tuberculeux, la défaillance de la spécificité a été maintes fois constatée.

Déjà, en 1906, Gengou avait vu que les bacilles tuberculeux humains, bovins, aviaires, pisciaires, les bacilles homogènes d'Arloing, certains bacilles acidorésistants : bacille du beurre, bacille de Korn, etc., avaient une valeur antigénique comparable pour fixer les sensibilisatrices contenues dans les sérums de cobayes infectés avec les bacilles humains.

Babès et Busila (1910) ont constaté que l'extrait éthéré du bacille de Timothée avait le même pouvoir fixateur que celui des bacilles tuberculeux.

Massol et Grysez (1914) ont montré que les bacilles diphtériques se comportent comme les bacilles tuberculeux dans la réaction de déviation du complément. Ils attribuaient ce résultat à des composants chimiques — d'après eux, des phospholipides — communs aux deux microbes.

Boquet et Nègre ont constaté également que les extraits méthyliques des bacilles diphtériques, du *bacillus subtilis*, de bacilles aviaires, pisciaires, de bacilles paratuberculeux, de champignons parasites, comme le cryptocoque de Rivolta, fixent l'alexine, à des titres divers, en présence de sérum antituberculeux.

In vivo, les extraits méthyliques du *bacillus subtilis*, de bacilles de la fléole et de bacilles diphtériques, après traitement préalable par l'acétone, produisent des anticorps qui dévient le complément, à la fois avec les antigènes correspondants et avec l'extrait méthylique de bacilles tuberculeux.

Enfin, les mêmes auteurs ont démontré que l'ovolécthine fixe également l'alexine en présence de sérum antituberculeux.

Tous ces faits montrent bien que la spécificité des antigènes tuberculeux est loin d'être absolue. Il est possible que ces divers antigènes, d'origines très différentes, aient parmi leurs composants chimiques un élément commun, qui — et c'est ce qui expliquerait la diversité des titres de la fixation de l'alexine — s'y trouverait dans des proportions variables.

On comprend combien on doit se garder de séparer le point de vue pouvoir antigène du point de vue constitution chimique. Les défaillances de la spécificité ne sont que des contradictions

apparentes. Il importe d'en rechercher les raisons dans la constitution chimique.

C'est là un point que nous ne pouvions passer sous silence, étant donné l'esprit dans lequel nous avons voulu développer notre thèse.

Avec la spécificité des antigènes tuberculeux est terminé l'exposé de la première partie de cette thèse.

Au cours de l'étude de l'isolement du fractionnement, de la purification et de la nature chimique des différentes fractions de Macheboëuf — matériaux de notre travail — et des antigènes-étalons, notre souci constant a été de ne point perdre de vue la stricte dépendance du pouvoir haptène par rapport à la constitution chimique, et nous pensons avoir répondu à ce principe en donnant, à propos de chaque fraction, le chiffre que nous avons obtenu lors de la recherche sérologique, en le confrontant, le commentant et le justifiant par le point de vue chimique.

Enfin, certaines questions touchant de très près notre sujet — pouvoir antigène *in vivo*, action thérapeutique, spécificité — ont été abordées, notamment dans l'étude des antigènes-étalons.

Connaissant déjà, dans l'ensemble, les résultats de nos recherches, l'interprétation qu'ils ont reçues et les conclusions que nous en avons tirées, il est aisé maintenant d'examiner comment, au seul point de vue technique, nos titrages ont été réalisés.

C'est à cet exposé que nous consacrons la deuxième partie de cette thèse. Intimement liée à la première, elle n'eût été sans les précisions que celle-ci a apportées, qu'un strict et sec énoncé de résultats, sans lien avec les facteurs qui ont concouru à leur production.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LE POUVOIR HAPTÈNE DES SUBSTANCES LIPIDIQUES ET LIPOIDIQUES EXTRAITES DU BACILLE TUBERCULEUX TUÉ PAR LA CHALEUR

Plan de la deuxième partie.

Elle est divisée en trois chapitres.

Dans le premier est rappelé le but de nos recherches.

Le deuxième traite de la réaction de déviation du complément, nos recherches portant sur l'étude du pouvoir haptène, et plus particulièrement des conditions d'invariabilité que certains des éléments mis en présence dans la réaction doivent rigoureusement remplir pour que le titrage comparatif du pouvoir antigène de plusieurs substances puisse être valable.

Enfin, le troisième est consacré à l'exposé complet de la technique de nos mesures.

Dans une première section est étudiée la préparation des différents éléments mis en présence lors du titrage et les mesures préliminaires (pouvoir anticomplémentaire, etc.) dont certains d'entre eux ont été l'objet avant la réaction elle-même.

Enfin, dans une deuxième section est exposé, avec les résultats, le titrage proprement dit du pouvoir haptène des antigènes-étalons et des différentes fractions dont l'émulsion a pu être réalisée.

CHAPITRE PREMIER

BUT DU TRAVAIL

Nous nous sommes proposé, à la suite des fractionnements récents de Machebœuf et de ses collaborateurs, de mesurer d'une manière précise le pouvoir haptène — c'est-à-dire l'aptitude à fixer l'alexine en présence du sérum anti correspondant, dans ce cas particulier sérum antituberculeux — des différentes substances lipidiques et lipoïdiques extraites des bacilles de Koch tués par la chaleur, dans des conditions telles que nous puissions, à ce point de vue, les comparer, d'abord entre elles, ensuite et surtout avec les antigènes tuberculeux classiques de Besredka et de Boquet et Nègre, mélanges chimiques complexes, choisis comme étalons de nos mesures en raison de la présence certaine parmi leurs composants de fractions lipidiques et lipoïdiques et que nous avons soumis, étant donné le rôle qu'ils jouaient dans nos recherches, aux mêmes conditions d'expérience.

Pour être réalisées, ces mesures nécessitaient évidemment au préalable la mise en émulsion dans le sérum physiologique des diverses fractions à examiner.

C'était là un premier obstacle, qu'il ne nous a pas été dans tous les cas possible de surmonter.

Cette étude du pouvoir haptène ne constitue, nous l'avons dit, que la première partie des recherches biologiques suscitées par le travail d'extraction de Machebœuf.

Ce dernier les poursuit, actuellement, par l'étude du pouvoir antigène *in vivo* et par celle de l'action thérapeutique sur la tuberculose expérimentale.

CHAPITRE II

LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

SECTION I

Le principe de la réaction de fixation.

Lorsqu'on introduit dans l'organisme d'un animal sensible des substances telles que des microbes, des toxines microbiennes ou végétales, des hématies, des cellules d'organes ou des substances albuminoïdes diverses, il apparaît dans le sang des substances spéciales, auxquelles on a donné le nom d'anticorps.

Les substances susceptibles de provoquer la formation d'anticorps constituent ce qu'on appelle les antigènes (Deutsch).

Tout anticorps est spécifique de son antigène. A côté de ce rôle *in vivo*, les antigènes présentent comme autre propriété, celle d'avoir de l'affinité pour les anticorps correspondants qu'ils font naître dans les humeurs, lorsqu'ils se trouvent mis « *in vitro* » en présence de ceux-ci et d'une quantité convenable d'alexine. C'est sur cette particularité qu'est basée la recherche du pouvoir haptène.

Le nombre des antigènes est illimité. Ils sont tous compris dans le groupe des colloïdes.

Les microbes, les toxines, les cellules d'organes, les extraits microbiens divers ne représentent pas, comme on pourrait le croire, un *antigène unique*, mais, au contraire, — parce que mélanges chimiques complexes, — un groupe, une « mosaïque d'antigènes », que caractérise, qu'individualise, en raison de sa prédominance quantitative, l'un ou l'autre de ces derniers et

dont chacun est susceptible de donner naissance, pour son propre compte, à un anticorps. Chaque anticorps se fixera, *in vivo* et *in vitro*, sur son antigène spécifique correspondant, mais il pourra se faire qu'un même antigène entre dans la constitution chimique de microbes, cellules, etc., d'origine différente, en un mot qu'il y ait un antigène commun à plusieurs « mosaïques » ; c'est le cas, déjà cité, de l'antigène de Forssmann, et vraisemblablement aussi celui de certains phospholipides complexes communs aux bacilles de Koch et de Löffler et à d'autres. Nous avons vu combien, à la lumière de ces faits, devient fragile la notion de spécificité antigénique des microbes, et, par corollaire, combien il est plus facile *d'en expliquer les prétendues défaillances*.

Quant aux anticorps, ils n'ont pu être isolés, et ne peuvent, de ce fait, être définis chimiquement. Gengou avait émis l'hypothèse que les anticorps sont des substances colloïdales amphotères, pouvant s'unir soit avec une substance colloïdale positive, soit avec une substance colloïdale négative.

Maurice Piëtre, dans des recherches (1926) qui lui ont permis de *localiser dans la sérum-albumine l'hémolysine d'un immun-sérum hémolytique, rend plus facilement accessible la question des anticorps*. « Mais, ajoute-t-il, elle n'est point résolue pour cela. Dès maintenant, elle fait surgir un problème des plus ardu : les propriétés spécifiques des sérums correspondent-elles à de nouvelles substances, à des entités chimiques ou bien à de simples modifications physico-chimiques des composants normaux du sérum ? »

Dès lors, en l'état actuel de nos connaissances, dans l'impossibilité d'affirmer qu'il s'agit de substances bien définies, les anticorps doivent être plutôt considérés comme correspondant à des propriétés acquises, dont la présence ou l'absence dans le sérum ne peut être décelée que par des réactions spéciales de laboratoire. L'anticorps, avons-nous dit, est spécifique par rapport à son antigène. Il est parfois lié à l'immunité et présente alors un caractère défensif (antitoxines tétaniques, diphtériques). Souvent il est lié à l'infection et n'exerce aucune action protectrice, comme c'est vraisemblablement et malheureusement le cas dans l'infection tuberculeuse.

Parmi les anticorps, les plus connus sont les agglutinines, les précipitines et les sensibilisatrices. Ce ne sont pas certainement des substances différentes les unes des autres, mais comme nous

ne les connaissons que par leurs effets, et que, par ailleurs, ceux-ci se manifestent sous des formes très diverses, on s'est habitué à distinguer pour chaque antigène autant d'anticorps que d'effets observés. Il est plus vraisemblable de supposer avec Césari et Nicolle, qu'à l'égard d'un antigène donné ne correspond qu'un seul et même anticorps, dont l'effet visible varie avec les conditions de l'expérience (présence ou non de l'alexine, comme nous le verrons plus loin).

Toutefois, pour la commodité de l'exposé, nous ferons usage du terme « sensibilisatrices ».

L'étude de ces dernières présente à l'heure actuelle un grand intérêt, car elles donnent de très utiles renseignements pour le diagnostic de certaines infections (tuberculose, fièvre typhoïde, morve), dont elles ne sont que les témoins, et — point important pour nous — c'est sur l'affinité que manifeste *in vitro* pour elles l'antigène correspondant qu'est basée la recherche du pouvoir haptène.

Pfeiffer, en 1894, en a démontré le premier l'existence, dans une expérience devenue classique : lorsqu'on injecte des vibrions cholériques dans le péritoine d'un cobaye vacciné contre le choléra, on constate que non seulement les microbes ne se multiplient pas, mais encore qu'ils perdent leur motilité, leur forme allongée et se transforment en boules ; que ces dernières deviennent granuleuses et ne tardent pas à se dissoudre en partie dans le liquide avoisinant.

Plus tard, Bordet et Gengou (1898), Ehrlich et Morgenroth (1899) ont étudié le mécanisme de ce phénomène. Après avoir constaté qu'*in vitro* la bactériolyse précédente ne se produit pas si on a préalablement soumis le sérum du cobaye vacciné contre le choléra à la température de 55° au bain-marie pendant 30 minutes, mais qu'elle se manifeste dès l'addition de tout sérum frais, ces auteurs ont conclu :

1° Que dans le sérum du cobaye vacciné contre le choléra, il existe deux substances qui ont des propriétés différentes : l'une se trouve dans tous les sérums normaux d'homme ou d'animal ; elle est thermolabile, c'est-à-dire détruite *intégralement* par un chauffage de 30 minutes à 55° : c'est l'« alexine » de Büchner, le « complément » d'Ehrlich, la « cytase » de Metchnikoff ; l'autre, qui n'existe que dans le sérum de l'homme ou de l'animal

immunisé, autrement dit spécifique ; elle est thermostable ; elle résiste, *en quantité notable*, au chauffage à 55° : c'est l'anticorps ou la sensibilisatrice de Bordet, l'ambocepteur d'Ehrlich ou le fixateur de Metchnikoff.

2° Que la bactériolyse du vibron cholérique est la résultante de l'*action combinée* de ces deux substances : l'une, la sensibilisatrice, « sensibilise » — à la manière d'un mordant, rendant un tissu apte à subir l'action des matières colorantes — le microbe (l'antigène) à l'action de l'autre (l'alexine), qui a pour mission de le détruire. Cette destruction *ne peut être réalisée, quelle que soit la dose d'alexine, s'il n'y a pas eu préalablement sensibilisation*.

Si, au lieu de vibron cholérique et de sérum de cobaye vacciné contre le choléra, l'antigène est constitué par des globules rouges et l'anticorps par un sérum renfermant une sensibilisatrice active pour ces derniers, l'action lytique se manifeste par l'hémolyse, c'est-à-dire par la mise en liberté de l'hémoglobine des globules.

L'hémolyse est facile à apprécier à l'œil nu, alors que la bactériolyse ne peut être mise en évidence qu'au microscope ; encore, tous les microbes ne sont pas aussi fragiles que le vibron cholérique et ne subissent pas ces métamorphoses, facilement constatables au microscope.

C'est dans le but de faciliter la constatation de la bactériolyse, ou plutôt de l'*adsorption* des sensibilisatrices sur l'antigène correspondant, que Bordet et Gengou ont réalisé, en 1901, la « réaction de fixation du complément ».

Pour bien saisir le principe de cette réaction, où entrent des phénomènes de bactériolyse et d'hémolyse, il faut bien se pénétrer des deux notions fondamentales suivantes :

1° L'hémolyse se produit dans des conditions identiques à celles de la bactériolyse et suivant un mode semblable.

Les hématies sont sensibilisées par l'anticorps spécifique à l'action destructive de l'alexine.

2° La bactériolyse et l'hémolyse demandent pour s'effectuer *des sensibilisatrices différentes*, mais une seule et même alexine, avec laquelle ces substances se combinent, est suffisante pour provoquer la destruction des bactéries et des hématies.

Ces notions très importantes étant rappelées, le principe de la réaction est plus facilement saisi :

1^o Dans un premier temps, on met en présence les éléments d'un système bactériolytique : un antigène et un anticorps correspondant, sérum de malade ou d'animal immunisé. Ce sérum est inactivé à 55°, pour détruire l'alexine ; on y ajoute de l'alexine (pratiquement du sérum frais de cobaye), à des doses convenables.

L'addition de sérum frais de cobaye après destruction de l'alexine du sérum à examiner, apparaît au premier abord, paradoxale. Mais elle se justifie aisément si l'on réfléchit — comme nous le verrons tout à l'heure — que c'est d'après la quantité d'alexine fixée que s'apprécie soit la teneur en sensibilisatrices d'un sérum, soit le pouvoir haptène d'un antigène. Or, comme on ne connaît ni l'activité, — celle-ci variant avec les sujets, — ni la quantité d'alexine contenue dans le sérum à étudier, il convient de la détruire, pour la remplacer par une autre, d'activité connue et mise en quantité convenable.

2^o Dans un deuxième temps, après un séjour d'une heure à l'étuve, on ajoute au système bactériolytique, les éléments d'un système hémolytique (hématies de mouton débarrassées de toute trace de sérum et sérum hémolytique inactivé par chauffage à 55° en quantité convenable).

Deux faits peuvent se produire :

a) Le sérum à examiner contient une sensibilisatrice ; dans ce cas, elle se fixe sur l'antigène. Le complément est ensuite « dévié » par ce système bactériolytique.

L'alexine n'étant plus libre, pour activer le sérum hémolytique, celui-ci est incapable de produire l'hémolyse. On dit alors que la réaction est *positive*.

L'absence d'hémolyse sert de témoin à la *fixation de l'alexine sur le complexe antigène-anticorps*.

b) Le sérum à examiner ne possède pas d'anticorps spécifique. Dans ce cas, l'antigène n'est pas « sensibilisé » et l'alexine ne peut se fixer sur ce dernier pour le détruire. Elle reste, de ce fait, libre. Lorsqu'elle est mise au contact des hématies de mouton et du sérum hémolytique inactivé, elle active ce dernier ; l'hémolyse se produit. Elle sert de témoin à la *non-fixation* de l'alexine

sur le complexe antigène-anticorps. On dit que la réaction *est négative*.

SECTION II

Le mécanisme de la réaction de fixation du complément.

A. Remarques préliminaires.

Une étude du mécanisme de la réaction de fixation du complément nous a paru indispensable. Ce mécanisme, en effet, intéresse au plus haut point une partie importante de notre sujet, à savoir : « le point de vue technique des réactions », et il convenait de le bien connaître pour ne pas, lors de recherches aussi délicates, se laisser, dans le choix des doses, uniquement guider par l'arbitraire. Comme nous allons le voir, il est nécessaire, lors de titrages comparatifs d'antigènes ou de sérums, de maintenir invariables les éléments du système hémolytique, d'une part, et de mettre, d'autre part, dans des proportions nettement définies, et que nous préciserons, les éléments du système bactériolytique, ceci, afin que la comparaison réciproque des résultats obtenus puisse être valable. Rien, mieux qu'un examen approfondi des relations existant entre l'antigène, les anticorps et l'alexine, ne peut montrer l'importance du choix des doses auxquelles les différents éléments doivent être opposés les uns aux autres.

B. Etude proprement dite.

Nous avons vu dans l'étude du principe de la réaction, que l'on détruisait avant la réaction elle-même l'alexine du sérum à examiner (recherche des anticorps) ou du sérum-type (titrage du pouvoir antigène) et qu'on la remplaçait par du sérum de cobaye de titre alexique connu.

C'est qu'en effet, on ne peut connaître l'activité d'un sérum ou d'un antigène que d'après la quantité d'alexine fixée par le complexe antigène-anticorps (système bactériolytique). Si, donc, on veut la mesurer d'une manière précise, il est nécessaire de connaître l'alexine, d'en définir une unité.

L'unité est constituée par la dose d'alexine juste suffisante pour déterminer l'hémolyse du système hémolytique choisi. On la dénomme « la dose minima active d'alexine ».

Lors de titrages comparatifs d'antigènes ou de sérums, la comparaison de leur activité s'établit d'après le nombre de doses minima actives d'alexine fixées. Il est donc nécessaire que l'unité soit fixe, soit la même dans tous les titrages.

Notons, dès à présent, que ce n'est pas, à proprement parler, la quantité de sérum alexique qui importe, mais son activité, de telle sorte que dans le cas de deux sérums dont l'un est trois fois plus actif que l'autre, il faudra, pour que l'unité (dose minima active) soit, toutes choses égales d'ailleurs, la même pour les deux, mettre dans le premier cas une quantité trois fois plus petite de sérum que dans le second.

L'activité d'un antigène ou d'un sérum anti s'apprécie donc d'après le nombre de doses minima actives d'alexine fixées, et elle sera d'autant plus grande que ce nombre le sera lui-même, de telle sorte qu'il y a entre les éléments antigène-alexine ou sérum-alexine une variation strictement proportionnelle ; ceci est représenté par le rapport $\frac{\text{alexine}}{\text{antigène ou sérum anti}} = \text{constante}$,

ou, d'une manière plus précise, par le rapport $\frac{N}{V} = \text{constante}$, dans lequel N représente le nombre de doses minima actives d'alexine fixées et V le volume du sérum ou de l'antigène.

De cette formule, on déduit que l'activité d'un antigène ou d'un sérum est représentée par le nombre de doses minima actives d'alexine fixées par une unité de poids ou de volume de l'antigène ou du sérum. L'unité de volume est généralement le centimètre cube. Lorsqu'il s'agit de substances antigéniques obtenues à l'état solide, comme c'est le cas ici, l'activité est mesurée au milligramme de l'antigène, et non au centimètre cube de l'émulsion mère. On en déduit encore que l'unité d'antigène ou d'anticorps est représentée par le volume de l'un ou de l'autre fixant une dose minima active d'alexine.

Lorsqu'il s'agit d'antigènes ou de sérums différents, il suffit, pour pouvoir les comparer entre eux, d'établir pour chacun d'eux le rapport $\frac{N}{V}$.

Mais ce parallélisme, cette variation strictement proportionnelle de l'alexine et de l'antigène ou du sérum, que nous venons de représenter par une formule, sans en étudier d'ailleurs les points délicats, ni les conditions rigoureuses qu'il faut respecter si l'on veut pouvoir en vérifier l'existence, n'apparaissent cependant pas évidents. Bien mieux, l'expérience démontre le contraire.

Quand, par exemple, on titre le sérum hémolytique, et qu'on en a déterminé la dose minima active pour une quantité donnée d'hématies en présence d'une quantité également donnée d'alexine, on constate que l'hémolyse peut être complète, bien que la dose d'alexine ait été diminuée, si l'on augmente, par ailleurs, la dose de sérum. Inversement, dans certains cas, on peut constater le phénomène inverse : l'hémolyse complète, grâce à une augmentation de la dose d'alexine, en dépit d'une diminution de la quantité de sérum. Le sérum comme l'alexine ont donc été, dans ces cas, susceptibles de se suppléer partiellement l'un à l'autre.

Mais que devient alors le fameux parallélisme, la variation strictement proportionnelle unissant ces deux éléments ?

Que devient dans ces conditions la formule $\frac{N}{V}$?

Comment la concilier avec ce fait d'expérience, le sérum variant en sens inverse de l'alexine ?

Cette contradiction n'est qu'apparente ; elle disparaît si l'on se pénètre bien des principes directeurs ci-après, et que nous avons pu, d'ailleurs, vérifier.

1° L'alexine ne se fixe sur l'antigène qu'après sensibilisation de ce dernier par le sérum anti correspondant.

2° A une quantité donnée de sérum correspond une quantité maxima d'alexine fixable. Autrement dit, en présence d'une quantité donnée de sérum, il y a une quantité *maxima* d'alexine *susceptible d'être fixée* sur l'antigène. Cette quantité maxima ne dépend que de la dose de sérum. Elle lui est proportionnelle.

3° La fixation de l'alexine s'arrête lorsque la quantité fixée atteint la quantité maxima correspondante, et ceci, alors même que l'hémolyse ne se serait pas encore produite.

Elle s'arrête également au moment où l'hémolyse se produit, alors même que la quantité fixée serait inférieure à la quantité maxima fixable correspondante.

C'est là le principe essentiel. Si l'alexine, en effet, continuait à être fixée tant que l'hémolyse ou la bactériolyse ne s'est pas produite, et ceci indépendamment de la dose ou de l'activité du sérum anti, dont le rôle se réduirait ainsi à sensibiliser plus ou moins l'antigène, on constaterait que ce sont les sérums les plus actifs qui fixent le moins d'alexine, et inversement, et l'emploi de la formule $\frac{N}{V}$ pour mesurer l'activité d'un sérum et d'un antigène conduirait à des résultats erronés.

4° Les doses d'alexine et de sérum juste suffisantes (doses minima actives) pour produire l'hémolyse d'une quantité donnée d'hématies, sont variables, mais elles varient dans des limites qui sont fixes.

Ces valeurs-limites sont propres à la dose *donnée* de l'antigène, la caractérisent et ne dépendent que d'elle ; elles sont de plus, comme d'ailleurs les valeurs intermédiaires situées entre les points extrêmes, proportionnelles à l'antigène (aux hématies).

Elles constituent des points de repère, grâce auxquels le mécanisme de la réaction de fixation devient facilement saisissable.

Ces valeurs-limites sont :

a) *Pour le sérum anti :*

α) La plus grande dose minima active. Elle correspond à la quantité maxima d'anticorps adsorbables sur l'antigène, autrement dit, à la saturation de l'antigène par le sérum. Dépassée, l'excès n'exerce aucune influence sur la réaction.

β) *La plus petite dose minima active*, qui est déterminée en présence d'un excès d'alexine, de manière que la quantité maxima fixable d'alexine correspondant à chacune des doses croissantes de sérum puisse être fixée.

b) *Pour l'alexine :*

α) La plus grande dose minima active. Elle correspond à la quantité maxima d'alexine fixable en présence de la plus petite dose minima active de sérum.

β) La plus petite dose minima active.

Les valeurs-limites étant précisées, examinons comment varie la quantité d'alexine fixée ou, ce qui revient au même, la dose minima active d'alexine (pour une quantité donnée d'hématies).

a) Quant le sérum varie de zéro à la plus petite dose minima active, l'alexine fixée varie de zéro à la plus grande dose minima active.

L'hémolyse demandant le concours du sérum et de l'alexine, la plus petite dose minima active de sérum est repérée en présence d'un excès d'alexine, de manière que la quantité maxima d'alexine fixable correspondant à chacune des doses croissantes de sérum, puisse être fixée. La quantité d'alexine fixée en présence de la plus petite dose minima active de sérum représente donc la quantité maxima fixable d'alexine correspondante.

Or, nous savons que cette dernière varie proportionnellement au sérum. Ainsi donc, dans l'intervalle situé entre zéro et la plus petite dose minima active de sérum, *au fur et à mesure* des doses croissantes de sérum, la quantité d'alexine fixée augmente proportionnellement, jusqu'à production d'hémolyse. Dans ce cas, la formule $\frac{N}{V}$ est vérifiée.

b) Quand le sérum varie de la plus petite à la plus grande dose minima active, l'alexine subit une variation inverse (c'est pourquoi la dose d'alexine fixée en présence de la plus petite dose minima active de sérum correspond à la plus grande dose minima active d'alexine pour la quantité donnée d'hématies) ; elle diminue, au contraire, de la plus grande à la plus petite dose minima active. Au fur et à mesure que la sensibilisation des hématies par le sérum augmente, la dose minima active d'alexine diminue. Elle reste constante à partir du moment où l'antigène est saturé par la plus grande dose minima active de sérum. Elle est alors égale à la plus petite dose minima active, laquelle ne varie pas, quel que soit l'excès du sérum par rapport à l'antigène.

Dans les limites susénoncées, le phénomène de suppléance de l'alexine par le sérum est donc indéniable. Plus l'antigène est sensibilisé, moins il faut d'alexine pour produire l'hémolyse, et, dès que sa saturation est réalisée, la dose d'alexine minima

active — et cela se conçoit, puisque la sensibilisation ne peut plus augmenter — reste constante.

Dans ces conditions, la formule $\frac{N}{V}$, dans laquelle V représente le volume du sérum ou de l'antigène, n'est pas vérifiée.

N augmente ou diminue quand V (antigène) reste fixe, et N diminue quand V (sérum) augmente. Dans les deux cas, que l'on envisage l'alexine par rapport à l'antigène ou l'alexine par rapport au sérum, la formule $\frac{N}{V} = \text{constante}$ apparaît paradoxale.

Comment la concilier avec l'existence de ce phénomène de suppléance ?

La difficulté disparaît si l'on se souvient que les doses-limites (la plus petite et la plus grande dose minima active de sérum et d'alexine pour une quantité donnée d'antigène), ainsi que les valeurs intermédiaires que ces éléments sont susceptibles de prendre, sont *proportionnelles à la quantité d'antigène et, par conséquent, proportionnelles entre elles*.

Si, par exemple, on a déterminé, pour une quantité donnée d'antigène, la plus petite ou la plus grande dose minima active de sérum et que, par la suite, on augmente x fois l'antigène, les deux doses extrêmes et les doses intermédiaires se trouveront augmentées également de x fois. La quantité d'alexine fixée variant, dans les limites que nous avons précisées, en sens inverse

du sérum, il faut, dès lors, pour que $\frac{N}{V(\text{antigène})} = \text{constante}$ soit

vérifié, que les points de repère (la plus petite dose, ou la plus grande dose de sérum, ou une valeur intermédiaire) soient les mêmes, lors de titrages successifs d'un même antigène et de titrages comparatifs de divers antigènes. Ces points de repère

variant proportionnellement à l'antigène, $\frac{N}{V}$ est vérifié. Autrement

dit, il faut que le degré de sensibilisation de l'antigène par l'anticorps soit le même dans tous les titrages, c'est-à-dire que le rapport existant entre la quantité d'anticorps adsorbés sur l'antigène et la quantité totale qu'il est susceptible d'adsorber reste constant (dans le cas de saturation de l'antigène par l'anticorps, ce rapport est égal à 1), et pour qu'il soit constant, il apparaît évident

qu'il est nécessaire de faire varier le sérum proportionnellement à l'antigène.

Ces notions étant connues, comment les appliquera-t-on au titrage du pouvoir haptène de divers antigènes et à celui des sensibilisatrices de différents sérums, pour que l'emploi de la formule $\frac{N}{V}$ soit valable.

1^o Titrage du pouvoir haptène.

La recherche de ce pouvoir consiste à déterminer la quantité d'alexine que peut fixer un volume donné d'antigène (en principe 1 cm³ de l'émulsion) en présence du sérum anti correspondant. Quelle dose de ce sérum opposera-t-on alors à l'antigène pour que $\frac{N}{V}$ soit vérifié ?

Il suffira de choisir un degré déterminé de sensibilisation de l'antigène, de mettre une dose de sérum anti donnée et de repérer la quantité d'alexine fixée. La même activité sera alors décelée, lors de titrages successifs d'un même antigène, si son degré de sensibilisation est resté fixe, c'est-à-dire si à une même dose d'antigène, on a opposé la même quantité de sérum, ou, si, dans le cas de variation de la dose d'antigène, il y a eu variation proportionnelle du sérum. Lorsqu'il s'agira de titrer plusieurs antigènes et de les comparer entre eux, il sera nécessaire, pour que la comparaison des résultats obtenus puisse être valable, que l'on soumette également les divers antigènes à *un même degré de sensibilisation*. Comme on ne connaît pas leur activité, le seul moyen de réaliser pour tous le même degré de sensibilisation, est de mettre le sérum en quantité telle par rapport aux antigènes, que, quelle que soit leur activité, ils en soient saturés, c'est-à-dire en quantité égale à la quantité maxima adsorbable. La saturation correspondant bien à un même degré de sensibilisation (le rapport de la quantité d'anticorps adsorbés à la quantité maxima adsorbable est dans ce cas égal à 1), la comparaison des rapports $\frac{N}{V}$ obtenus pour les divers antigènes sera possible.

La quantité d'alexine fixée sera égale, du fait de la saturation, à ce qu'on appelle, lorsque l'antigène est constitué par des hématies, la plus petite dose minima active.

Cette dose étant proportionnelle à l'antigène, et à la quantité maxima adsorbable de sérum correspondante, si, pour un antigène A, elle est deux fois plus grande que pour un antigène B, on en conclut que pour sensibiliser au même degré ces deux antigènes, il a fallu deux fois plus de sérum pour le premier que pour le second,

et $\frac{N}{V}$ est vérifié. Le premier adsorbe deux fois plus d'anticorps que le second.

En pratique, la dose de sérum que l'on doit opposer pour réaliser la saturation est déterminée par rapport à la quantité d'alexine mise en doses croissantes ou fixes, dans la réaction, *l'antigène étant dilué jusqu'à ce qu'il ne fixe plus que cette quantité.*

Remarquons, pour terminer, que la saturation choisie comme même degré de sensibilisation correspond à la quantité maxima d'anticorps adsorbables par l'antigène, ce qui est l'expression la plus directe de son activité *in vitro*.

2° Titrage des sensibilisatrices.

Il faut, dans ce cas, que l'antigène soit en quantité suffisante pour que *toutes* les sensibilisatrices susceptibles d'exister dans le sérum à titrer puissent être adsorbées sur lui. Lorsqu'il s'agit de titrer et de comparer entre eux différents sérums, l'emploi de la formule $\frac{N}{V}$ serait, comme dans le cas précédent, valable s'il était possible de réaliser le même degré de sensibilisation *de la dose d'antigène-type opposée*.

Mais l'activité des sérums étant inconnue, puisque c'est précisément ce que l'on recherche, la réalisation d'un même degré de sensibilisation est impossible.

On tourne la difficulté en mettant l'antigène en dose telle que le sérum anti, à la dose où il fixe la quantité d'alexine mise dans la réaction, soit en quantité inférieure ou tout au plus égale à la plus petite dose minima active correspondante. Nous savons, en effet, que de zéro à la plus petite dose minima active de sérum anti (par rapport à une quantité donnée d'antigène), l'alexine se fixe proportionnellement au sérum.

La quantité d'alexine fixée dans ces conditions est, nous l'avons vu, égale à la quantité maxima fixable pour la quantité de sérum anti opposée.

Il s'ensuit qu'une même dose de sérum permet la fixation d'une quantité d'alexine beaucoup plus grande lorsqu'elle est suffisante pour saturer l'antigène, que lorsque ce dernier est opposé en quantité telle qu'elle est inférieure à la plus petite dose minima active.

Dans le premier cas, la fixation se fait jusqu'à atteindre la plus petite dose minima active (pour la dose d'antigène donnée), alors que dans le deuxième cas, elle se poursuit jusqu'à atteindre la dose maxima fixable pour la quantité donnée de sérum.

C'est là un point dont il faut tenir le plus grand compte lorsqu'on compare, d'après la valeur que prend N lors des titrages, la quantité d'anticorps décelée dans un sérum (titrage des sensibilisatrices) et la quantité maxima d'anticorps adsorbés sur un antigène (titrage du pouvoir haptène).

Si la quantité d'alexine est la même dans les deux cas, la quantité d'anticorps révélée par le titrage du pouvoir haptène est, en réalité, beaucoup plus considérable que celle révélée par le titrage du sérum.

Ces remarques, d'ailleurs, ne donnent que des indications approximatives, et l'on ne peut se contenter « d'à peu près » quand il s'agit, lors du titrage d'un sérum ou d'un antigène, de mettre ces éléments en doses convenables, de manière que l'emploi de la formule $\frac{N}{V}$ puisse être valable.

On est ainsi amené à se demander comment on peut se rendre compte que l'antigène est saturé par le sérum (titrage du pouvoir haptène) ou que le sérum est, par rapport à l'antigène, en quantité inférieure à la plus petite dose minima active (titrage du sérum).

Les précisions données sur le mécanisme intime de la réaction vont nous en procurer facilement le moyen.

10 Nous savons, que la quantité d'alexine fixée (dose minima active), laquelle diminue à mesure que le sérum augmente de la plus petite à la plus grande dose minima active, reste constante à partir du moment où la quantité maxima de sérum est adsorbée (saturation réalisée par la plus grande dose minima active de sérum).

Dépassée, l'excès n'exerce plus aucune influence sur la dose minima active d'alexine.

Dans ces conditions, pour se rendre compte si, lors d'un premier titrage, l'antigène était saturé, il suffira, lors d'un deuxième titrage, d'augmenter la dose de sérum.

S'il y avait saturation, la quantité d'alexine fixée dans le deuxième cas se trouvera être égale à celle fixée dans le premier cas, soit $N' = N$.

Si $N' \neq N$, il y aura lieu d'augmenter le sérum jusqu'à ce que $N' = N$.

2° Pour vérifier, lors du titrage d'un sérum, que la dose de sérum était inférieure à la plus petite dose minima active par rapport à l'antigène, il suffira d'augmenter l'antigène, dans l'épreuve de vérification.

Si $N' = N$, il sera démontré que la fixation de l'alexine avait atteint la quantité maxima fixable pour la dose de sérum opposée et, par corollaire, que cette dose était inférieure ou tout au plus égale à la plus petite dose minima active.

Si $N' \neq N$, il y aura lieu d'augmenter l'antigène jusqu'à ce que $N' = N$.

Nous donnons, dans le tableau suivant, l'interprétation des résultats susceptibles d'être observés lors d'une épreuve de vérification.

1° *En augmentant le sérum :*

a) $N' = N$:

L'antigène est saturé. Sérum en excès ou tout au moins en dose égale à la quantité maxima adsorbable.

b) $N' > N$:

Dose de sérum inférieure à la plus petite dose minima active.

c) $N' < N$:

Dose de sérum comprise entre la plus petite et la plus grande dose minima active.

2° *En diminuant le sérum :*

$N' = N$:

Sérum en excès (malgré la diminution, l'antigène reste saturé) ; il était par conséquent en excès.

3° *En augmentant l'antigène :*

$N' > N$:

(Le sérum est en dose supérieure à la plus petite dose minima active.)

$N' = N$:

Le sérum est en dose inférieure à la plus petite dose minima active.

SECTION III

Des conditions que doivent rigoureusement remplir, lors de titrages comparatifs d'antigènes, les éléments de la réaction de fixation.

1° Complexe antigène-anticorps.

Les considérations précédentes nous ont montré la nécessité qu'il y a, pour pouvoir comparer entre elles les activités obtenues pour divers antigènes en appliquant la formule $\frac{N}{V}$, de réaliser pour tous *un même degré de sensibilisation* par l'antisérum-type. Dans les conditions pratiques, on opère toujours de façon que la saturation de l'antigène par l'anticorps soit atteinte. Nous avons vu comment on pouvait s'assurer que cette condition était bien remplie.

La dose convenable de sérum-type étant déterminée, il y aura lieu de la laisser fixe au cours des titrages successifs, afin que la saturation de l'antigène soit toujours réalisée.

2° Système hémolytique.

La comparaison de l'activité des différents antigènes étant faite d'après la quantité d'alexine fixée par chacun d'eux, quantité d'alexine dont l'unité est représentée par la dose d'alexine juste suffisante pour produire l'hémolyse du système

hémolytique, il est nécessaire, pour que la comparaison puisse être valable, que cette dose minima active soit la même dans tous les titrages.

Or, nous savons :

a) Qu'elle varie, tout d'abord, en fonction de la quantité d'antigène, dans le cas du système hémolytique, de la quantité d'hématies à hémolyser. Toutes choses égales du côté du degré de sensibilisation, elle varie en raison directe de cette quantité. Il y aura donc lieu de maintenir fixe *cette dose d'hématies*.

b) Qu'elle dépend encore, pour une même quantité d'hématies, de leur degré de sensibilisation par le sérum hémolytique et qu'elle peut varier, selon ce degré, entre deux limites fixes, qui sont la plus petite et la plus grande dose minima active. Quand on fait varier le sérum de sa plus petite à sa plus grande dose minima active, l'alexine varie, en sens inverse, de la plus grande dose à la plus petite dose minima active.

Il y aura donc lieu, pour réaliser dans tous les titrages un même degré de sensibilisation des hématies, d'utiliser *le même sérum hémolytique et à la même dose*.

Dans les conditions pratiques, et afin d'avoir une unité d'alexine *la plus petite possible*, on oppose aux hématies un grand excès de sérum hémolytique, de telle sorte que, ces dernières étant saturées, la dose minima active repérée correspond à la plus petite valeur qu'elle est susceptible de prendre.

Il résulte de ce grand excès de sérum hémolytique, qu'une faible variation dans la dose et l'activité de ce dernier ne saurait diminuer le degré de sensibilisation (la saturation) et que, par corollaire, la dose minima active d'alexine correspondante représenterait encore *la plus petite* dose minima active.

Mais pour éviter des vérifications, on laisse fixe, dans tous les titrages, la quantité de sérum en excès.

c) Enfin, — et il ne faut pas l'oublier, — la dose minima active d'alexine dépend de la durée du séjour à l'étuve et de la température de cette dernière. Elle varie en sens inverse d'elles.

Il y aura donc lieu de maintenir constants ces deux derniers facteurs.

Tous ces facteurs restant constants, la dose minima active d'alexine repérée lors de titrages successifs sera fixe et constituera, par conséquent, une unité d'égale valeur.

La quantité d'alexine représentant cette dose minima active pourra, évidemment, si son titre varie, et toutes choses égales du côté de la dilution choisie, prendre des valeurs différentes. Mais la dose minima active d'alexine n'en restera pas moins invariable, puisque — nous le savons — elle n'est, à proprement parler, qu'une « unité d'activité ».

CHAPITRE III

TECHNIQUE DU TITRAGE DU POUVOIR HAPTÈNE DES SUBSTANCES LIPIDIQUES ET LIPOIDIQUES EXTRAITES DES BACILLES TUÉS PAR LA CHALEUR

SECTION I

Préparation des différents éléments de la réaction.

Comme nous le savons déjà, les éléments nécessaires à une réaction de fixation (mesure du pouvoir haptène) sont :

- 1° une émulsion d'hématies lavées ;
- 2° un sérum hémolytique ;
- 3° une alexine ;
- 4° un sérum-type connu, riche en anticorps ;
- 5° l'antigène à étudier.

Nous allons donc maintenant décrire les différentes techniques qui nous ont permis de préparer ces éléments et d'effectuer, sur certains, les titrages *préliminaires nécessaires*. L'antigène à étudier dans chaque réaction est constitué par l'une des fractions lipidiques ou lipoidiques. Comme nous les connaissons déjà au point de vue de la préparation chimique, nous n'envisagerons ici que leur mise en émulsion dans l'eau physiologique.

PREMIÈRE SOUS-SECTION

Préparation de l'émulsion d'hématies lavées.

Nous avons utilisé du sang de mouton. Celui-ci est recueilli, par ponction aseptique de la veine jugulaire, ou au moment de la jugulation à l'abattoir, dans un ballon stérile renfermant des perles de verre. Il est agité pendant une dizaine de minutes, jusqu'à ce que la fibrine soit séparée en un gros caillot et que le sang surnageant reste liquide.

Il est ensuite nécessaire de laver les globules rouges, pour les débarrasser complètement de sérum. Nous avons effectué ce lavage au moyen d'un centrifugeur électrique.

Dans chaque tube du centrifugeur, on met environ les deux tiers de sang défibriné, en ayant soin de marquer son niveau d'un trait au crayon de verre.

Les hématies sont séparées par centrifugation, puis le sérum surnageant est décanté et remplacé par une quantité égale d'eau salée à 90/100. Le mélange est secoué énergiquement et centrifugé à nouveau. Le liquide surnageant est de nouveau décanté et remplacé par un égal volume d'eau physiologique. Nous avons renouvelé cette opération jusqu'à ce que le liquide surnageant devint complètement incolore (en moyenne cinq fois).

On le décante et on verse dans le tube la quantité d'eau physiologique convenable pour ramener au volume primitif qu'occupait le sang défibriné, c'est-à-dire jusqu'au niveau du trait marqué sur le tube à centrifuger. Toutes ces manipulations ont été faites aseptiquement. Les hématies ainsi préparées, et non soumises à un procédé de conservation quelconque, doivent être employées dans les quelques jours qui suivent.

Leur préparation exige un temps assez long. Aussi, pour y procéder le moins souvent possible, comme nous ne disposions pas, d'autre part, de glacière, nous avons eu recours, pour leur conservation, au procédé d'Armand-Delille et Launoy. Il consiste à ajouter aux hématies, immédiatement après le dernier lavage, du formol du commerce (à 40 volumes), dans la proportion de 1/500. Grâce à cet antiseptique, nous avons pu, en général, conserver intactes les hématies de mouton pendant une vingtaine

de jours. C'est le meilleur procédé de conservation. Nous avons constaté une fois, cependant, l'hémolyse *spontanée* après quinze jours seulement de préparation, et pour nos titrages définitifs, nous avons préféré utiliser des globules frais.

SOUS-SECTION II

Préparation et titrage du sérum hémolytique.

1° La préparation. — Pour obtenir un bon sérum hémolytique vis-à-vis des globules de mouton, il est nécessaire d'avoir recours à une espèce qui produise facilement des sensibilisatrices, mais seulement de faibles quantités d'agglutinines. Il faut aussi que son sérum ne soit pas naturellement hémolytique pour les hématies de mouton. Le lapin et le cheval sont les animaux qui remplissent le mieux ces conditions. Le sérum hémolytique que nous avons utilisé nous a été fourni par l'Institut Pasteur et est préparé chez le cheval.

Le cheval reçoit sous la peau de l'encolure, une première fois, 20 cm³ de globules de mouton et, ensuite, tous les sept jours, 12 cm³ de ces globules. Il faut de 7 à 10 semaines pour obtenir un sérum actif.

Sept jours après la dernière injection, le cheval est saigné. On lui tire environ 6 litres de sang. Immédiatement après la saignée, il reçoit, une dernière fois, 15 cm³ de globules sous la peau ; puis, il est saigné à nouveau huit jours après. Le sérum des deux saignées a sensiblement le même pouvoir hémolytique.

Le sérum est ensuite réparti en ampoules, qu'on scelle et qu'on chauffe à 60° pendant 30 minutes, deux jours de suite, ceci pour détruire l'alexine.

2° Le titrage. — Nous l'avons effectué suivant la méthode de Calmette et Massol.

Ce titrage consiste à rechercher la quantité minima de ce sérum suffisante pour hémolyser une quantité donnée d'hématies en présence d'une quantité également donnée d'alexine. Cette quantité d'alexine doit constituer un excès par rapport au sérum.

On prépare une dilution à 1% du sérum à examiner, en mettant 1 cm³ de sérum dans 99 cm³ d'eau salée à 9%.

Dans une série de 10 tubes à essai, on verse successivement 0 cm³ 1, 0 cm³ 2... jusqu'à 1 cm³ de cette dilution. On ajoute à chacun d'eux une quantité d'alexine en excès, — pour être sûr qu'il y en a une dose au moins égale à la quantité maxima fixable correspondant aux doses croissantes de sérum, — par exemple 0 cm³ 5 d'une dilution au 1/10^e de sérum frais de cobaye, puis 1 cm³ d'une émulsion de globules de mouton à 1/20^e ; on complète ensuite tous les tubes avec de l'eau salée à 9‰ au volume total de 3 cm³. Un onzième tube constitue le tube-témoin alexine : il ne reçoit pas de sérum ; un douzième, le tube-témoin sérum : il ne reçoit pas d'alexine. Chaque tube est agité, pour rendre bien homogène le mélange, et le portoir est mis à l'étuve à 37° pendant une demi-heure. Après ce séjour, on procède à la lecture des résultats.

SCHÉMA DU TITRAGE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE

N ^{os} des tubes	Emulsion de globules à 5 p. 100 (en cm ³)	Sérum hémolytique chauffé dilué à 1 p. 100 (en cm ³)	Alexine diluée à 1 p. 10 (en cm ³)	Eau salée à 9 p. 1.000 (en cm ³)	Résultats après un séjour de 30 minutes à l'étuve à 37°
1	1	0,1	0,5	1,4	Pas d'hémolyse
2	1	0,2	0,5	1,3	—
3	1	0,3	0,5	1,2	—
4	1	0,4	0,5	1,1	—
5	1	0,5	0,5	1	—
6	1	0,6	0,5	0,9	Hémolyse
7	1	0,7	0,5	0,8	—
8	1	0,8	0,5	0,7	—
9	1	0,9	0,5	0,6	—
10	1	1	0,5	0,5	—
Témoin : alexine	1		0,5	1,5	Pas d'hémolyse
Témoin : S. H.	1	1		1	—

Le sérum que nous avons utilisé hémolysait 1 cm³ d'hématies au 1/20^e à la dose de 0 cm³ 6 (de la dilution au 1/100^e) en présence de 0 cm³ 5 d'alexine au 1/10^e, d'où, en convertissant 0 cm³ 006 de sérum en présence de 0 cm³ 05 d'alexine. Du fait de l'excès d'alexine, lequel permet, nous le savons, jusqu'à production d'hémolyse, la fixation sur les hématies de la quantité

maxima fixable d'alexine correspondant à chacune des doses croissantes de sérum hémolytique, la dose minima active de ce dernier, ainsi repérée, représente, pour la quantité donnée d'hématies, la plus petite dose minima active.

Ainsi que Calmette et Massol le recommandent, nous avons employé dans chacune de nos réactions, *pour la même quantité d'hématies à hémolyser*, un grand excès de sérum hémolytique : 25 fois la dose minimum hémolysante ; cet excès offre, en effet, de nombreux avantages : d'une part, il permet de négliger les hémolysines naturelles susceptibles d'exister dans le sérum-type, lesquelles ne peuvent, dans ces conditions, abaisser la dose minima active d'alexine repérée lors du titrage préliminaire de cette dernière, puisqu'elles ne font qu'augmenter l'excès de sérum hémolytique, c'est-à-dire celui que les hématies, déjà saturées, n'ont pu adsorber.

D'autre part, et surtout, il permet d'abaisser au maximum la dose minima active d'alexine pour 1 cm³ d'hématies (1/20^e), la quantité maxima correspondante de sérum hémolytique étant *adsorbée* sur ces dernières, de telle sorte, que la *plus petite trace* d'alexine manifesterait sa présence par une action dissolvante sur les globules sensibilisés. Les plus petites fixations seront donc décelées. De la plus grande dose minima active qu'elle était, du fait de sa dose en excès, lors du titrage du sérum hémolytique, la quantité d'alexine fixée, grâce à la saturation des hématies, a pris une valeur égale à la plus petite dose minima active. Alors que le sérum est passé de la plus petite à la plus grande dose minima active, l'alexine, au contraire, a varié de la plus grande à la plus petite (phénomène de suppléance signalé et interprété plus haut).

SOUS-SECTION III

Obtention et titrage de l'alexine.

1^o Obtention. — Nous avons utilisé le sérum frais de cobaye. Il fournit la meilleure alexine. Le sang est recueilli aseptiquement par ponction du cœur ou par saignée à la carotide et le sérum est obtenu par centrifugation du sang défibriné.

Massol et V. Grysez ont étudié l'influence du vieillissement sur l'activité de l'alexine. En conservant dix sérums de cobaye, dans la glacière à 4-6°, ils ont vu que le pouvoir alexique baissait rapidement dès le deuxième jour. Au bout de neuf jours, presque tous les sérums n'avaient plus que de 12 à 37% de leur valeur initiale.

Parmi les procédés préconisés pour la conservation de l'alexine, nous citerons celui de Massol, qui utilise le froid, et celui de Massol et Novaczinski, auquel nous avons eu recours lors de nos essais de titrages.

Le premier consiste à soumettre l'alexine pendant tout le temps qu'on désire la conserver, à la température de — 10° à — 15°, produite par un appareil frigorigène.

Pendant le premier mois, la baisse du pouvoir alexique des sérums frais de cobaye, conservés dans ces conditions, a varié de 30 à 50%. Mais après neuf mois, les mêmes sérums avaient gardé de 20 à 33% de leur valeur initiale.

Le procédé de Massol et Novaczinski — que nous avons utilisé — nous a toujours donné satisfaction : le sérum frais de cobaye est additionné d'un dixième de son volume d'eau saturée de NaCl (36 grammes par litre). Au moment de l'emploi, il suffit de faire la dilution dans l'eau distillée pour restituer au sérum sa tonicité normale.

Des titrages effectués à plusieurs jours d'intervalle *avec le même sérum hémolytique* nous ont montré que par cette méthode le titre alexique reste intact pendant au moins 8 jours, quelquefois pendant 10, 12 et même 15 jours ; après 18, 20 jours, il possède encore 75% de sa valeur, et après 25 jours, 25%.

C'est donc un procédé de conservation excellent, très pratique et particulièrement utile lors de titrages comparatifs.

Nous avons cependant eu recours à de l'alexine fraîche pour nos titrages définitifs.

2° Titrage. — L'expérience a montré que la valeur de l'alexine est variable d'un cobaye à l'autre ; de plus, nous venons de voir que le titre de l'alexine soumise à un procédé de conservation diminuait progressivement. Il est donc, dans tous les cas, indispensable de titrer cette alexine avant de l'utiliser pour les expériences proprement dites. Cette nécessité s'impose, qu'il s'agisse ou non de titrages comparatifs, et c'est pour l'avoir

négligée, que beaucoup d'expérimentateurs ont obtenu des résultats souvent entachés d'erreurs.

L. Massol et V. Grysez, d'autre part, ont montré que l'alexine perd la moitié de son titre initial si elle reste diluée au vingtième de son volume primitif pendant une heure, que nous savons être le temps nécessaire à la réaction de fixation. Cette notion est d'une très grande importance, et elle ne devra jamais être perdue de vue, lors de la mise en pratique de la réaction. On a conseillé, pour annuler l'effet de l'abaissement très rapide de l'activité de l'alexine diluée au $1/20^e$, d'en doubler la dose minima active, repérée lors de son titrage.

Nous n'avons pas, dans nos recherches, utilisé ce procédé, car le rapport de $1/2$ existant entre l'activité initiale et l'activité de l'alexine une heure après la dilution, n'est qu'un rapport approximatif. Dès lors, nous avons préféré, ainsi que Calmette n'a cessé de le recommander, nous mettre, pour le titrage de l'alexine, dans des conditions identiques à celles de la réaction de fixation pour la recherche du pouvoir haptène.

Nous avons fait une dilution au $1/50^e$ du sérum de cobaye dans l'eau salée à 9‰ . On introduit dans une série de tubes à réaction $0\text{ cm}^3\ 1$, $0\text{ cm}^3\ 2$... jusqu'à 1 cm^3 de cette dilution. Il est quelquefois nécessaire de mettre de plus fortes doses, si l'on fait usage d'alexine vieillie. Nous n'avons, cependant, pas eu besoin de le faire, ayant employé, lors de nos essais, de l'alexine — conservée par le procédé de Massol et Novaczinski — préparée au maximum depuis huit jours, et lors de nos titrages définitifs, de l'alexine fraîche.

On complète tous les tubes à 2 cm^3 avec de l'eau salée à 9‰ et on les porte à l'étuve à 37° pendant une heure, de manière à se mettre dans des conditions identiques à celles de la réaction de fixation elle-même. Après ce séjour de une heure à l'étuve, nous ajoutons dans chaque tube 25 doses minima actives du sérum hémolytique inactivé dont nous disposons, et dont la dose minima est — nous l'avons vu, dans la sous-section précédente — $0\text{ cm}^3\ 006$ pour 1 cm^3 d'hématies ($1/20^e$), soit, par conséquent, $0\text{ cm}^3\ 15$ de sérum pur ; et, enfin, 1 cm^3 d'hématies au $1/20^e$ (la même dose, évidemment, que celle que nous avons utilisée lors du titrage du sérum hémolytique). On porte le tout à l'étuve à 37° pendant 30 minutes.

SCHÉMA DU TITRAGE DE L'ALEXINE

N ^{os} des tubes	Une heure d'étuve à 37°		Une demi-heure d'étuve à 37°		
	I		II		
	Alexine diluée à 1 p. 50 (en cm ³)	Eau salée à 9 p. 1.000 (en cm ³)	Emulsion de globules à 5 p. 100 (en cm ³)	Sérum hémolytique (25 doses minima) (en cm ³)	Résultats après le séjour de 30 minutes à l'étuve à 37°
1	0,1	1,9	1	0,15	Pas d'hémolyse
2	0,2	1,8	1	0,15	—
3	0,3	1,7	1	0,15	—
4	0,4	1,6	1	0,15	—
5	0,5	1,5	1	0,15	Hémolyse
6	0,6	1,4	1	0,15	—
7	0,7	1,3	1	0,15	—
8	0,8	1,2	1	0,15	—
9	0,9	1,1	1	0,15	—
10		1	1	0,15	—
Témoin : alexine	1	1,15	1		Pas d'hémolyse
Témoin : S. H.	1	2	1	0,15	—

La dose active d'alexine est indiquée par le premier tube de la série où l'on constate l'hémolyse. On prend cette dose comme dose minimum dans les expériences de fixation. La dose active des différentes alexines que nous avons titrées, lors de nos recherches, a varié de 0 cm³ 5 à 0 cm³ 75 de la dilution au 1/50^e.

Dans la réaction de fixation, pour ne pas l'employer sous un trop grand volume, nous l'avons diluée au 1/10^e seulement.

Rappelons, pour terminer, que la dose minima active d'alexine titrée avec un grand excès de sérum hémolytique représente, pour la quantité donnée d'hématies, *la plus petite dose minima active d'alexine*.

SOUS-SECTION IV

Le sérum-type.

Nous avons vu précédemment que, de même qu'il faut, lors du titrage des anticorps d'un sérum, opposer à ce dernier un antigène actif en dose telle qu'il soit en excès, de même et inver-

sement, il est nécessaire, dans une mesure d'activité antigénique, de mettre en présence de la substance à étudier, un sérum connu, particulièrement riche en anticorps, de manière qu'elle puisse éventuellement en être « saturée », la détermination de cette « capacité » étant précisément le but recherché.

A. Préparation d'un sérum tuberculeux riche en anticorps.

L'expérience a montré que le meilleur procédé d'enrichissement des sérums en anticorps consiste à traiter, soit des animaux spontanément tuberculeux, soit des animaux artificiellement infectés, par des injections répétées de bacilles tuberculeux vivants et virulents dans les veines ou plus simplement de tuberculines ou d'extraits bacillaires sous la peau.

Le sérum que nous avons utilisé pour nos recherches a été préparé chez le cheval au moyen d'injections répétées de bacilles B. C. G.

Les chevaux ainsi traités fournissent dès le deuxième jour après la dernière injection, un sérum déjà riche en sensibilisatrices tuberculeuses, et dont la teneur en anticorps augmente encore pendant les jours qui suivent.

Le titrage des sensibilisatrices de notre sérum-type, préparé selon cette technique, nous a en effet montré qu'il déviait un nombre de doses minima actives d'alexine assez considérable.

B. Titrage du sérum-type.

Il a été effectué par la méthode de Calmette et Massol et avec un système hémolytique identique dans ses doses à celui utilisé pour l'étude du pouvoir haptène des différentes fractions de Machebœuf (1 cm³ d'hématies au 1/20^e et 25 doses minima actives de sérum hémolytique).

La nécessité d'un pareil titrage préliminaire est évidente. Nous savons, en effet, de par les remarques faites précédemment sur le mécanisme de la réaction de fixation, que l'étude *in vitro* du pouvoir antigène consiste à rechercher la quantité maxima d'anticorps correspondants susceptibles d'être adsorbés sur une unité de poids ou de volume de substance à examiner, et qu'il

est nécessaire, par ailleurs, si l'on veut comparer, à ce point de vue, plusieurs fractions d'après le nombre de doses minima actives d'alexine déviées, que cette saturation de l'antigène par l'anticorps soit, pour toutes, réalisée ; or, pour qu'elle le soit à coup sûr, il faut opposer le sérum-type en quantité telle qu'il soit en excès par rapport à l'antigène ; d'où la nécessité, pour le choix de cette dose, d'en connaître la teneur en anticorps.

Nous avons dès le premier titrage dilué le sérum au $1/20^e$. Cette dilution initiale nous permettait d'abord de diminuer d'autant le nombre des titrages successifs à effectuer sur les dilutions de plus en plus grandes du sérum. Ensuite, elle rendait presque inutile la recherche spéciale du pouvoir anticomplémentaire du sérum, que l'on sait susceptible d'exister dans les sérums purs ou faiblement dilués et pour la mesure duquel les six tubes-témoins sérum de la réaction de fixation proprement dite, étaient, dès lors, à la dilution au $1/20^e$, nettement suffisants.

C'est ce qu'en effet, nous avons constaté.

Technique. — On part de trois séries de tubes :

La première comprend 10 tubes ; elle reçoit $0\text{ cm}^3\text{ }2$ de la dilution voulue du sérum à examiner, préalablement inactivé à 55^0 pendant 30 minutes, et 1 cm^3 d'antigène méthylé dilué au $1/20^e$. La deuxième série (tubes-témoins sérum, au nombre de 6) reçoit uniquement $0\text{ cm}^3\text{ }2$ de la dilution de sérum (dilutions également variables avec les titrages). La troisième série (3 tubes-témoins antigène) reçoit la même quantité d'antigène, soit 1 cm^3 , que les tubes de la première série.

Dans chaque tube des trois séries, on ajoute ensuite des doses croissantes d'alexine, titrée au préalable en partant de la dose minima active égale à $0\text{ cm}^3\text{ }1$ de la dilution au $1/10^e$. Le volume total de chaque tube est ramené à $2\text{ cm}^3\text{ }5$ avec de l'eau physiologique.

Puis, après agitation des tubes, on porte à l'étuve à 37^0 pendant une heure. Après ce séjour, on ajoute le système hémolytique (1 cm^3 d'hématies au $1/20^e$ et 25 doses minima actives de sérum hémolytique). On agite de nouveau chaque tube, on reporte à l'étuve à 37^0 pendant *une demi-heure* et on lit les résultats.

TITRAGE DU SÉRUM ANTITUBERCULEUX TYPE

Nos des tubes	Une heure d'étuve à 37°				Une demi-heure d'étuve à 37°		
	I				II		
	Sérum-type à des dilutions de plus en plus grandes, inactivé à 55° (en cm ³)	Antigène méthylique dilué à 1 p. 20 (en cm ³)	Alexine diluée à 1 p. 10, active à 0,1 (en cm ³)	Eau salée à 9 p. 1.000 (en cm ³)	Emulsion de globules à 5 p. 100 (en cm ³)	Sérum hémolytique chauffé (25 doses minima) (en cm ³)	Résultats après le séjour de 30 minutes à l'étuve à 37°
1	0,2	I	0,1	1,2	I	0,15	Pas d'hémolyse
2	0,2	I	0,2	1,1	I	0,15	—
3	0,2	I	0,3	I	I	0,15	—
4	0,2	I	0,4	0,9	I	0,15	—
5	0,2	I	0,5	0,8	I	0,15	Hémolyse
6	0,2	I	0,6	0,7	I	0,15	—
7	0,2	I	0,7	0,6	I	0,15	—
8	0,2	I	0,8	0,5	I	0,15	—
9	0,2	I	0,9	0,4	I	0,15	—
10	0,2	I	I	0,3	I	0,15	—
Témoins: sérum	1		0,1	2,2	I	0,15	—
	2		0,2	2,1	I	0,15	—
	3		0,3	2	I	0,15	—
	4		0,4	1,9	I	0,15	—
	5		0,5	1,8	I	0,15	—
Témoins: antigène	1	I	0,1	1,4	I	0,15	Pas d'hémolyse
	2	I	0,2	1,3	I	0,15	Hémolyse
	3	I	0,3	1,2	I	0,15	—
	4	I	0,4	1,1	I	0,15	—
	5	I	0,5	I	I	0,15	—
Témoins: alexine	1		0,1	2,4	I	0,15	—
	2		0,2	2,3	I	0,15	—
	3		0,3	2,2	I	0,15	—
	4		0,4	2,1	I	0,15	—

Résultats. — Nous avons dû diluer jusqu'au $1/50^e$ et effectuer ainsi 4 titrages successifs.

Le premier tube où l'hémolyse complète était constatée était le tube n° 6 ; d'où, en appliquant la formule $\frac{N}{V}$, une teneur en sensibilisatrices égale à $\frac{5}{0,004} = 1.250 \text{ unités}$.

L'antigène présentait un pouvoir anticomplémentaire égal à une dose minima active d'alexine. Ce faible pouvoir empêchant disparaissant en présence de sérum normal, nous n'en avons pas tenu compte dans l'évaluation des résultats.

Quant au pouvoir anticomplémentaire du sérum, il était à peine, à la dilution au $1/20^e$, égal à une dose minima active d'alexine, et, à la dilution au $1/30^e$, il avait complètement disparu.

Notre sérum-type était donc d'une teneur en anticorps suffisante pour que nous pussions l'employer même assez fortement dilué dans les titrages du pouvoir antigène, et ceci d'autant plus que nous avons effectué ces derniers par la méthode des doses croissantes d'antigène avec une dose fixe d'alexine égale à 2,5 doses minima actives seulement.

Pour qu'il soit nettement en excès par rapport à l'antigène, nous l'avons employé à la dose de $0 \text{ cm}^3 5$ de la dilution au $1/25^e$, correspondant à 25 unités d'alexine.

Il y a donc un rapport égal à 10 entre la dose fixe d'alexine ($0 \text{ cm}^3 25$) — élément intermédiaire et parallèle à l'antigène — choisie pour nos titrages et la teneur en anticorps de la dose de sérum-type utilisée.

En réalité, ce rapport n'est pas égal à 10. Il est inférieur à ce nombre, car, du fait de l'excès d'antigène (1 cm^3 d'antigène méthylique dilué au $1/20^e$), les anticorps sont mesurés d'après la quantité maxima d'alexine susceptible d'être fixée en leur présence, alors que le pouvoir haptène de l'antigène, en raison de la saturation par l'anticorps, n'est déterminé que d'après la *plus petite dose minima active* d'alexine correspondante.

Cependant, compte tenu de cette différence, la dose de $0 \text{ cm}^3 5$ la dilution au $1/25^e$ est encore largement suffisante pour réaliser par rapport à l'antigène l'excès indispensable à l'interprétation comparative des résultats. En effet, nous nous sommes assuré, en diminuant cette dose légèrement, que la quantité d'alexine fixée ne variait pas ; ceci prouve que $0 \text{ cm}^3 5$ ($1/25^e$) de sérum-

type, non seulement sature l'antigène, mais encore, constitue un excès par rapport à lui.

SOUS-SECTION V

Mise en émulsion et titrages préliminaires des différentes fractions de Machebœuf.

§ 1^{er}. — Leur mise en émulsion.

La mise en émulsion des différentes fractions de Machebœuf a constitué la partie la plus importante et la plus longue de la préparation des divers éléments de la réaction.

Elle ne s'est pas avérée toujours aisée et, en dépit des artifices de technique auxquels nous avons eu recours, — artifices tenant compte de la solubilité observée, lors de fractionnements, à l'égard des solvants classiques des graisses, — elle a abouti dans quelques cas à des échecs complets. Toutefois, et d'une manière générale, le plus grand nombre des fractions ont pu, grâce à une technique appropriée et méthodiquement suivie, être émulsionnées dans l'eau salée à 9‰, sans action primitive des solvants des graisses, avec lesquels la préparation devenait plus longue et plus compliquée (titrage du pouvoir anticomplémentaire du solvant, évaporation s'il y a lieu, etc.).

Le taux de nos émulsions mères a été de 1 cgr. d'extrait pour 20 cm³ de sérum physiologique. Il était certes un peu faible, celui choisi habituellement dans les laboratoires étant de 1 cgr. pour 10 cm³ d'eau physiologique, taux par conséquent deux fois plus fort. Si nous l'avons choisi, c'est que nous avons constaté sur les premières fractions que nous avons émulsionnées, qu'une fois l'émulsion réalisée, — même facilement, — il se produisait après un long repos une sorte de précipité constitué par un agglomérat de parcelles d'extraits, qu'il était, par la suite, assez difficile de dissocier, même par une agitation violente. Il était dès lors logique de penser qu'en diminuant le taux de l'émulsion, cette dissociation serait beaucoup plus facilement réalisée. C'est ce qu'en effet, nous avons constaté. Bien que cette précaution n'eût pas été nécessaire pour certaines fractions très facilement émulsionnables et pour lesquelles la précipitation au

repos ne se produisait pas ou était aisément surmontée, nous l'avons appliquée à toutes, et ceci dans le but d'opérer toujours d'une façon parfaitement comparable pour les diverses fractions.

Ces remarques préliminaires étant faites, voici qu'elle a été notre technique. Nous décrirons tout d'abord la technique générale — commune à toutes les fractions — que nous nous sommes proposé de suivre, puis nous donnerons pour chacune d'elles les remarques faites au cours des essais d'émulsion.

A. Technique générale.

Il fallait tout d'abord peser une quantité déterminée de la fraction, un centigramme par exemple. Cette pesée était importante. Il était nécessaire de l'effectuer avec une balance de précision, permettant une pesée très exacte.

La pesée faite dans des conditions rigoureuses, nous procédions alors aux opérations suivantes :

a) Nous commençons par dissocier la substance à étudier à l'aide d'un fil de platine ou d'un agitateur très fin, afin de faciliter la mise en émulsion ultérieure. Certaines substances se réduisaient ainsi en poudre, d'autres s'étaient seulement, plus ou moins, sur les parois du tube.

b) Nous commençons ensuite l'essai de mise en émulsion *en versant goutte à goutte* sur la substance un centimètre cube d'eau salée à 9^o/100. Par ce procédé, nous évitions la formation d'agglomérats, l'antigène absorbant au fur et à mesure, lentement, mais intégralement, le liquide dont on l'imprégnait. Nous aidions ce commencement d'émulsion, d'abord avec le fil de platine, ensuite, après addition de deux nouveaux centimètres cubes d'eau physiologique, à l'aide de billes de verre mises dans le tube contenant l'antigène, l'ensemble étant agité soigneusement pendant quelques instants. Nous n'avions recours aux billes de verre que dans les cas où l'action de l'agitateur était restée sans effet.

Deux ordres de résultats pouvaient alors être constatés :

Premier cas. — L'émulsion commençait à se réaliser, de telle sorte que nous pouvions prévoir qu'elle serait parfaite après addition d'une plus grande quantité d'eau physiologique. Dans

ce cas, nous versions encore dans le tube quelques centimètres cubes (3-4) et nous agitions de nouveau.

L'émulsion parfaite se réalisant progressivement, nous complétions progressivement avec de l'eau physiologique, au taux de 1 cgr. pour 20 cm³, en agitant avec des billes de verre, de manière à rendre l'émulsion bien homogène.

Nous repérions sur le tube, avec le crayon à verre, le niveau qu'atteignait le liquide, puis nous bouchions hermétiquement, afin qu'il ne se produisît aucune évaporation.

Deuxième cas. — L'émulsion ne semblait pas devoir se réaliser. C'est alors que nous attaquions avec les différents solvants des graisses (acétone, alcool, éther, chloroforme). Dans le choix du solvant à employer pour chaque fraction, nous nous guidions sur ses caractères de solubilité, mis en évidence par Machebœuf et ses collaborateurs (acétone pour la fraction A, alcool pour la fraction B, éther pour la fraction D et chloroforme pour la fraction E).

Le choix du solvant étant fait, nous en mesurons un centimètre cube, que nous versions dans le tube, et le tout était agité, pour tenter de réaliser l'émulsion. Nous utilisions également, dans ce cas, l'agitateur, pour favoriser la dissociation de la substance et l'absorption du solvant. Si après cet essai, nous ne constatons aucun résultat, nous attaquions par un centimètre cube d'un nouveau solvant (éther ou chloroforme s'il y avait eu action préalable de l'acétone par exemple). Nouvelle agitation, puis nous laissons évaporer le ou les solvants, soit sous le vide sulfurique ou à P²O⁵, soit tout simplement à l'air libre pendant 24 heures au laboratoire. Cette évaporation s'imposait en raison du pouvoir anticomplémentaire assez intense de certains solvants.

Jamais dans ces cas, nous n'avons immédiatement après l'action des solvants, rajouté de l'eau physiologique, laquelle aurait gêné leur évaporation et surtout aurait entravé la dissociation par eux de l'antigène.

Le niveau du liquide était marqué au crayon de verre et nous mettions le tube débouché sous le vide sulfurique ou nous le laissons pendant 24 heures au laboratoire.

Ce n'est qu'après évaporation, au moins partielle, — totale pour l'acétone, — du ou des solvants — ce que nous pouvions constater grâce au trait indiquant le niveau primitif du liquide —

que nous rajoutions de l'eau physiologique, en petites doses d'abord, pour mieux nous rendre compte du degré de dissociation de l'antigène et ne pas compromettre la réalisation de l'émulsion, puis — pour les substances commençant à s'émulsionner — en plus grande quantité, jusqu'à parfaire le taux de 1 cgr. pour 20 cm³. Nouvelle agitation, en vue d'obtenir une suspension homogène d'aspect colloïdal; enfin, le niveau du liquide était repéré et le tube bouché.

Malgré ces artifices, trois fractions se sont révélées « réfractaires » à l'émulsion : après action et évaporation des solvants, elles ont opposé au sérum physiologique la même résistance et nous n'avons pas, pour celles-là, poussé plus loin nos essais.

Les émulsions mères devant rester de nombreux jours au laboratoire avant leur titrage, et craignant de ce fait la destruction du pouvoir haptène par les microbes (action de décomposition chimique), toutes ces manipulations furent effectuées le plus aseptiquement possible et les émulsions furent conservées à la glacière.

B. Technique spéciale à chaque fraction et observations faites au cours de la mise en émulsion.

1° Les échecs.

Les différentes fractions qu'il a été impossible d'émulsionner sont :

a) La fraction B₁ (substances phosphorées).

L'action *primitive* du sérum physiologique est restée sans résultats.

Nous l'avons attaquée d'abord par l'alcool, puis par le chloroforme. Au moment de l'action de ces solvants, la « dissociation » semblait, partiellement au moins, s'effectuer, mais après évaporation sous le vide sulfurique, elle s'est montrée à l'égard des essais d'émulsion aussi réfractaire qu'antérieurement.

b) Les fractions D et E (fractions éthérée et chloroformique).

Il en a été de même pour les fractions D et E, que nous avons traitées, la première à l'éther, la deuxième au chloroforme.

Après évaporation de ces solvants, elles ont opposé à l'action du sérum physiologique la même résistance que primitivement. Nous n'avons pas poussé plus loin nos essais.

2° *Les fractions pour lesquelles il a fallu recourir aux solvants des graisses.*

Ces fractions sont :

a) *La fraction acétonique totale* (graisses du bacille).

Après action de deux centimètres cubes d'acétone sur un centigramme de cette fraction et évaporation, l'émulsion a pu être réalisée assez facilement. Toutefois, nous avons dû, pour la rendre homogène, la soumettre à une forte agitation, et nous avons constaté après un repos de quelques heures, qu'il se constituait des agglomérats de substances, qui ne faisaient que s'accroître avec le temps et dont la dissociation n'était alors réalisée que difficilement à froid. Un léger chauffage de l'émulsion au bain-marie lui rendait rapidement, après une courte agitation, son aspect homogène.

b) *La fraction C₂* (substance acidorésistante non purifiée).

La mise en émulsion a été difficile. Traitée par l'alcool, puis par l'éther, elle a résisté encore notablement après évaporation à l'action de l'eau physiologique, et ce n'est que par une violente agitation que la dissociation a commencé à s'effectuer ; encore, n'avons-nous pas pu en réaliser une véritable suspension, ayant quelque stabilité, la précipitation de parcelles se produisant dès que l'agitation cessait ; et, pour chaque titrage, nous avons dû prolonger cette dernière pendant longtemps, avant de faire le prélèvement.

c) *La fraction C₄ purifiée* (traces de la fraction B éliminées de C, qu'elles souillaient).

Après action de l'alcool, puis de l'éther, et après évaporation, l'émulsion s'est faite très lentement, mais d'une manière beaucoup plus homogène que pour la précédente. Une précipitation se produisait également au repos, mais une agitation de courte durée suffisait à lui faire récupérer son aspect colloïdal primitif.

3° *Les fractions pour lesquelles l'emploi des solvants des graisses n'a pas été nécessaire.*

Ce sont :

a) *Les fractions β_1 et β_2 (glycérides de nature particulière avec traces de phosphore, substances lipidiques sans glycérol).*

Leur mise en émulsion a été facile et la suspension obtenue, qui avait l'aspect véritablement colloïdal, se maintenait, même après un long repos, et une faible agitation au moment des prélèvement pour titrage, était suffisante pour lui rendre toute son homogénéité.

b) *La fraction B_3a (traces de substances acidorésistantes souillant B_3).*

L'action primitive de l'eau physiologique a suffi, mais la suspension n'a été réalisée que très lentement, et au repos, la formation d'agglomérats était rapide. Ce résultat n'est pas surprenant : on ne pouvait espérer que la mise en émulsion de cette fraction serait plus facile, puisqu'elle appartient aux substances (non purifiées, il est vrai) présentant la propriété dite d'acidorésistance.

c) *La fraction B_3b (traces de B_2 accompagnées de substances mal connues souillant B_3).*

La mise en émulsion n'a présenté aucune difficulté et la stabilité de la suspension était satisfaisante ; léger trouble seulement au repos.

d) *La fraction B_2 purifiée (phospholipides).*

La suspension a été très facilement obtenue, mais après un long repos à froid, des agglomérats extrêmement résistants se produisaient, et il fallait agiter fortement pendant quelques minutes pour que leur dissociation commençât à s'effectuer. Mais, contrairement à ce que nous avons pu constater pour d'autres fractions, cette dissociation à peine commencée, le retour à l'aspect colloïdal était *très rapidement* effectué.

e) *La fraction B_2 brute et le groupe $B_2 + B_3$.*

Mise en émulsion facile. Un léger trouble indiquant une faible précipitation était constaté au repos ; mais il ne se produisait pas d'agglomérats véritables.

Par conséquent, stabilité satisfaisante et, par corollaire, retour rapide à l'homogénéité.

f) *La fraction C₃* (substance acidorésistante).

La suspension s'est effectuée très lentement. De plus, il se produisait au repos un précipité assez difficilement réductible.

g) *La fraction Φ* (substance acidorésistante purifiée).

Même remarque que pour la précédente. Précipité à froid plus résistant encore à la dissociation.

A l'examen des observations faites au cours des mises en émulsion, on constate, qu'à l'exception de B₁, qui a abouti à un échec, ce sont les fractions issues de la fraction primordiale B ou lui appartenant qui se sont révélées les plus facilement émulsionnables.

Au contraire, les fractions issues de C et la fraction acétonique totale ont opposé à l'action de l'eau physiologique une résistance plus ou moins grande.

§ 2. — Le titrage du pouvoir anticomplémentaire des fractions émulsionnées.

Quelle que soit sa nature, tout antigène qui se trouve en excès par rapport à la quantité d'alexine qui lui est opposée, est susceptible, par lui seul, *en l'absence d'anticorps*, d'en fixer une quantité élevée. Pour qu'une réaction de fixation soit valable, il est, dès lors, indispensable que l'alexine soit fixée sur l'antigène au moyen de l'anticorps à des doses où l'antigène, à lui seul, n'en fixe point ou qu'une quantité négligeable. Avant de mettre en pratique une réaction de fixation, il faut donc déterminer la dose exacte à laquelle l'antigène devient absorbant pour la quantité de complément employé, afin de n'employer cet antigène qu'à des doses inférieures non absorbantes.

Cette opération préliminaire de mesure du pouvoir anticomplémentaire des antigènes est nécessaire, que l'on titre par la méthode des doses croissantes d'alexine ou par celle des doses croissantes d'antigène.

Mais alors qu'il est possible avec la méthode des doses fixes d'antigène (méthode Calmette-Massol), d'utiliser l'antigène à des

doses où il fixe encore une petite quantité d'alexine, quantité que les tubes-témoins antigène de la réaction de fixation permettent de mesurer et dont on tient compte dans l'établissement des résultats, avec la méthode des doses croissantes d'antigène, au contraire, — et c'est notre cas, — il est absolument indispensable de n'opposer l'antigène à l'anticorps qu'à partir des dilutions où il ne fixe plus aucune quantité d'alexine, et ceci en raison du pouvoir anticomplémentaire partiel qui, en cas d'emploi de doses absorbantes, s'additionnerait dans les tubes de réaction, d'où une grande difficulté pour fournir une appréciation précise de la teneur en anticorps d'un sérum à expertiser ou du pouvoir haptène d'un antigène. Il serait en effet trop long de mesurer le pouvoir anticomplémentaire de chaque dose croissante de l'antigène.

Enfin, cette mesure préliminaire se justifie encore plus lorsque la mise en émulsion — et c'est encore notre cas — a nécessité l'emploi de solvants des graisses, lesquels, — certains tout au moins, — au cas où l'évaporation n'en aurait pas été intégrale, ajouteraient leur pouvoir anticomplémentaire à celui de l'antigène.

Dans notre cas particulier, deux raisons importantes : méthode des doses croissantes d'antigène, emploi des solvants, commandent donc, avant la mise en œuvre de la réaction, la mesure précise du pouvoir anticomplémentaire.

A. Technique.

On ne part que d'une seule série de tubes.

Nous avons dilué chaque émulsion mère avec des quantités croissantes d'eau physiologique : 1/10^e, 1/20^e, 1/30^e, etc.

Nous avons pris une quantité fixe de chacune des dilutions, soit 1 cm³ (la plus forte des doses croissantes d'antigène dans nos titrages du pouvoir haptène), que nous avons mise en présence de doses croissantes d'alexine, à partir de la dose minima active, repérée évidemment selon la même technique (système hémolytique identique) que pour la réaction de fixation.

On complétait au volume total de 3 cm³ avec de l'eau physiologique.

Les tubes étaient agités et portés à l'étuve à 37° pendant une heure. Après ce temps de contact, dans chaque tube, nous ajoutons le système hémolytique : 1 cm³ d'une émulsion de

globules préalablement sensibilisés par 25 doses minima actives de sérum hémolytique.

Les tubes étaient de nouveau agités et reportés à l'étuve à 37° pendant une demi-heure.

Après ce séjour à l'étuve, les résultats étaient lus.

**TABLEAU-TYPE DU TITRAGE DU POUVOIR
ANTICOMPLÉMENTAIRE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS**

N ^{os} des tubes	Une heure d'étuve à 37°			Une demi-heure d'étuve à 37°	
	I			II	
	Antigène (fractions) à des dilutions variables (en cm ³)	Alexine diluée à 1 p. 10, active à 0,1 (en cm ³)	Eau physiologique à 9 p. 1.000 (en cm ³)	Emulsion de globules à 5 p. 100 (en cm ³)	Sérum hémolytique chauffé (25 doses minima) (en cm ³)
1	I	0,1	1,4	I	0,15
2	I	0,2	1,3	I	0,15
3	I	0,3	1,2	I	0,15
4	I	0,4	1	I	0,15
5	I	0,5	0,9	I	0,15
6	I	0,6	0,8	I	0,15

B. Résultats.

Le pouvoir anticomplémentaire a été recherché pour chaque fraction sur *un centimètre cube* des différentes dilutions.

Titrant le pouvoir haptène par la méthode des doses croissantes d'antigène, — doses croissant de 0 cm³ 1 à 1 cm³, — le choix d'un centimètre cube des différentes dilutions des antigènes comme dose d'étude s'imposait. Les résultats n'eussent pu, en effet, être valables, si nous les avions obtenus avec une dose inférieure à la plus grande dose *opposée à l'alexine lors du titrage du pouvoir haptène*.

Pour chacune des fractions étudiées, la dilution à partir de laquelle tout pouvoir complémentaire avait disparu était la suivante :

- 1° Fraction C₄ purifiée : dilution au 1/40^e.
- 2° Groupe B₂ + B₃ : dilution au 1/30^e.
- 3° Fraction B₂ brute : dilution au 1/30^e.
- 4° Fraction B₂ purifiée : dilution au 1/30^e.
- 5° Fraction C₂ : dilution au 1/30^e.

6° Fraction acétonique totale : dilution au 1/40^e.

7° Fraction Φ : dilution au 1/30^e.

8° Fraction C_3 : dilution au 1/30^e.

9° Fraction β_1 : dilution au 1/20^e.

10° Fraction β_2 : dilution au 1/20^e.

11° Fraction B_{3a} : dilution au 1/30^e.

12° Fraction B_{3b} : dilution au 1/30^e.

A l'examen des résultats, on voit immédiatement que les différentes fractions que le fractionnement chimique permet de rattacher à la même substance plus ou moins purifiée (fractions C_2 , C_3 , Φ , B_{3a} , constituées par des cires acidorésistantes à des degrés plus ou moins grands de pureté), ont présenté le même pouvoir anticomplémentaire.

Les résultats, cependant, n'eussent été certainement pas identiques pour toutes ces fractions — car le degré de pureté n'est évidemment pas sans influence sur l'intensité du pouvoir anticomplémentaire — si le taux des dilutions successives avait été plus rapproché. Nous avons, en effet, dilué successivement au 1/10^e, au 1/20^e, au 1/30^e, etc., et l'écart entre chaque dilution est trop grand pour que les résultats répondent strictement à la réalité, mais il n'en est pas moins vrai qu'ils corroborent singulièrement ceux obtenus au point de vue chimique au cours des fractionnements.

Par ailleurs, on remarque que les fractions C_4 et acétonique totale, pour la mise en émulsion desquelles nous avons dû avoir recours aux solvants des graisses (acétone, éther), sont celles qui présentaient le pouvoir anticomplémentaire le plus élevé. N'y a-t-il pas là un rapport de cause à effet ? Il y a lieu de penser que l'évaporation de ces solvants n'a pas été, dans ces cas, intégralement réalisée, et que leur pouvoir absorbant propre s'est ajouté à celui de l'antigène.

Afin d'écarter entièrement et à coup sûr lors des titrages du pouvoir haptène, l'influence du pouvoir anticomplémentaire, et d'éviter ainsi l'emploi de séries nombreuses de tubes-témoins antigène, lesquels, d'ailleurs, si la recherche est faite par la méthode des doses croissantes d'antigène, ne sauraient, pour les raisons exposées plus haut, donner de renseignements précis sur ce point, nous n'avons pour toutes les fractions et antigènes-étalons, titré qu'à partir de la dilution au 1/50^e.

SECTION II

Le titrage proprement dit du pouvoir antigène in vitro des différentes fractions émulsionnées.

A. Choix d'une méthode.

Le pouvoir antigène peut être mesuré — nous le savons — soit par la méthode des doses croissantes d'alexine, l'antigène restant fixe, soit par la méthode des doses croissantes d'antigène, l'alexine restant fixe. La première de ces méthodes présente le très grand avantage — et c'est d'ailleurs dans ce but qu'elle a été mise au point par Calmette et Massol — d'éviter la possibilité de conclure à une réaction positive, en raison de l'addition d'actions *empêchantes partielles*. Nous avons, cependant, lors de nos recherches, opté pour la seconde.

Deux raisons, d'inégale valeur, nous ont, l'une imposé, l'autre inspiré ce choix.

D'abord le motif de nécessité :

Le nombre de titrages que nous avons effectués (titrages d'essais et titrages définitifs) a été considérable. Comme nous avions prévu cette éventualité, il nous a paru prudent de ne pas titrer avec du sérum-type *pur*, bien que nous en disposions d'une assez grande quantité. Or, nous avons vu, dans la section consacrée à l'étude du mécanisme de la réaction de fixation, que lors du titrage du pouvoir antigène, il était nécessaire de mettre le sérum-type en quantité telle, que, quelle que fût l'activité de l'antigène, celui-ci pût en être saturé intégralement.

Bien que notre sérum-type fixât 1.250 unités d'alexine au centimètre cube, la dilution à employer avec la méthode des doses croissantes d'alexine en présence de 10 doses minima actives d'alexine, aurait dû être assez faible pour que la quantité d'alexine déviée par la dose de sérum opposée à l'antigène fût très supérieure — l'excès étant indispensable — à la quantité d'alexine mise en doses croissantes dans les dix tubes de la réaction. Or, pour déterminer, au moins approximativement, cet excès, il faut se souvenir que l'activité d'un sérum est mesurée par la *quantité maxima* d'alexine fixable en sa présence, alors que

celle de l'antigène ne l'est — du fait de sa saturation — que *par la plus petite dose minima active* correspondante.

Tenant compte de ces considérations, et après vérification par la méthode signalée plus haut, nous avons, dans nos titrages, arrêté à $1/10^e$ le rapport existant entre la dose fixe d'alexine (2,5 doses minima actives) et celle déviable par le sérum, en employant ce dernier à la dose de $0\text{ cm}^3\ 5$ de la dilution au $1/25^e$ (correspondant à 25 doses minima actives).

Pour maintenir ce rapport constant, il eût donc fallu, avec la méthode des doses croissantes d'alexine (10 tubes = 10 doses minima), opposer une quantité de sérum quatre fois plus grande.

Mais à ce motif de nécessité, s'est ajouté un motif d'opportunité. Par le jeu combiné des doses croissantes d'antigène — dans le rapport de 1 à 10 — et des dilutions successives faites de 10 fois en 10 fois plus grandes, nous arrivions, dans notre cas particulier, après trois titrages seulement, à la dilution au $1/5.000^e$, tout en ayant parcouru et passé par un assez grand nombre de dilutions intermédiaires, alors qu'avec la méthode des doses fixes d'antigène, les titrages successifs eussent dû être beaucoup plus nombreux pour que les substances fussent examinées au même nombre de dilutions. C'est là une simplification dans la recherche, qui n'est pas négligeable et qui, à elle seule, justifierait le choix de la méthode des doses croissantes d'antigène.

Enfin, en commençant nos titrages à des dilutions auxquelles le pouvoir absorbant avait complètement disparu, nous nous sommes libéré de l'inconvénient essentiel de cette méthode, à savoir : celui de l'addition d'actions empêchantes partielles.

B. Doses des différents éléments de la réaction.

Nous rappelons quelles ont été les doses auxquelles ont été employées les différents éléments de la réaction lors de nos titrages définitifs :

1^o Taux des émulsions mères des antigènes : 1 cgr. pour 20 cm^3 , soit 0 mgr. 5 pour 1 cm^3 .

2^o Système hémolytique :

a) Hématies : 1 cm^3 au $1/20^e$;

b) Sérum hémolytique : 25 doses minima actives, soit $0\text{ cm}^3\ 15$ (pur).

3° Alexine : 2,5 doses minima actives, soit 0 cm³ 25 de la dilution au 1/10^e.

La dose minima active d'alexine a été déterminée pour tous nos titrages, y compris celui du sérum-type, avec *le même sérum hémolytique et la même dose d'hématies*, ce que nous savons être nécessaire pour que la comparaison des résultats puisse être valable, tout au moins en ce qui concerne la dose d'hématies, une légère variation dans l'activité de deux sérums hémolytiques successivement employés ne pouvant avoir, à notre sens, aucune influence sur la détermination de la dose minima active d'alexine, *lorsqu'ils sont employés en très grand excès par rapport à la dose d'hématies*.

4° Système bactériolytique :

a) Antigène : de 0 cm³ 1 à 1 cm³ à partir de la dilution au 1/50^e, et aux dilutions progressivement croissantes avec les titrages successifs ;

b) Sérum-type : 0 cm³ 5 de la dilution au 1/25^e, dose correspondant à 25 doses minima actives d'alexine fixées, d'où le rapport 1/10 existant entre la dose invariable d'alexine (0 cm³ 25) de nos titrages — laquelle mesure l'antigène — et celle de sérum.

Nous avons pu vérifier, par une technique signalée dans l'étude du mécanisme de la réaction de fixation, que cette dose était suffisante pour réaliser par rapport à l'antigène l'excès sans lequel les résultats obtenus sur différentes substances ne sauraient être comparés.

C. Technique.

Nous sommes parti de trois séries de tubes : une essentielle, deux accessoires.

1° La première comprenait 10 tubes, dans chacun desquels nous avons introduit 0 cm³ 5 de sérum-type (dilution : 1/25^e) inactivé par un chauffage préalable de 30 minutes à 55°, puis des doses des diverses émulsions (y compris les antigènes-étalons) à des dilutions différentes suivant le titrage (doses variant de 0 cm³ 1 à 1 cm³), et enfin, 0 cm³ 25 d'alexine, soit 2,5 doses minima actives.

2° Les deux séries de tubes accessoires étaient constituées par :

a) les tubes-témoins *sérum* (au nombre de 6), dans chacun desquels nous avons versé 0 cm³ 5 de *sérum-type*, comme précédemment, et des doses croissantes d'*alexine*, en partant de la dose minima active ;

b) les tubes-témoins (au nombre de 4) dans lesquels n'ont été mises que des doses croissantes d'*alexine*, le premier contenant la dose minima active. .

Les tubes des trois séries étaient ensuite complétés au volume de 2 cm³ 5 avec de l'eau salée à 90/100.

Puis, ils étaient agités et étaient portés à l'étuve à 37° pendant une heure.

Après ce temps de contact, nous ajoutions dans chaque tube 1 cm³ d'une émulsion de globules de mouton à 5 % préalablement sensibilisés par le *sérum hémolytique*, dans les proportions que nous connaissons.

Les tubes étaient à nouveau secoués et portés à l'étuve à 37° pendant une demi-heure, et on procédait à la lecture des résultats ; on notait d'abord la dose d'*antigène* fixant les 2,5 doses minima actives d'*alexine*, c'est-à-dire le premier tube où l'hémolyse n'était pas constatée, puis, le cas échéant, le tube-témoin *sérum* mesurant le pouvoir anticomplémentaire de ce dernier, afin que la déduction nécessaire pût en être effectuée dans le calcul de l'activité.

D. Résultats (calcul du pouvoir haptène).

Nous avons appliqué la formule $\frac{N}{V}$.

Le *sérum-type* à la dose de 0 cm³ 5 (1/25^e) n'a présenté aucun pouvoir anticomplémentaire.

En raison des erreurs dues à l'espacement des dilutions auxquelles ont été étudiées les substances, les nombres représentant les activités antigéniques seront donnés avec deux chiffres significatifs seulement, le troisième chiffre étant un 5 ou un 0, pour les nombres composés de quatre chiffres, et avec trois chiffres significatifs pour les nombres composés de cinq chiffres.

La méthode ne permet pas une précision plus grande.

**TABEAU-TYPE DU TITRAGE DU POUVOIR ANTIGÈNE
DES DIFFÉRENTES FRACTIONS**

Nos des tubes	Une heure d'étuve à 37°				Une demi-heure d'étuve à 37°		
	I				II		
	Sérum antituberculeux type chauffé dilué à 1 p. 25 (en cm ³)	Antigène (fractions à examiner) à des dilutions variables (en cm ³)	Alexine diluée à 1 p. 10, active à 0,1 (en cm ³)	Eau salée à 9 p. 1.000 (en cm ³)	Emulsion de globules à 5 p. 100 (en cm ³)	Sérum hémolytique chauffé (25 doses minima) (en cm ³)	Résultats après un séjour de 30 minutes à l'étuve à 37°
1	0,5	0,1	0,25	1,65	I	0,15	Le premier tube où l'hémolyse n'est pas constatée re- présente la plus petite dose de l'antigène fixant les 2,5 doses mini- ma actives d'alexine.
2	0,5	0,2	0,25	1,55	I	0,15	
3	0,5	0,3	0,25	1,45	I	0,15	
4	0,5	0,4	0,25	1,35	I	0,15	
5	0,5	0,5	0,25	1,25	I	0,15	
6	0,5	0,6	0,25	1,15	I	0,15	
7	0,5	0,7	0,25	1,05	I	0,15	
8	0,5	0,8	0,25	0,95	I	0,15	
9	0,5	0,9	0,25	0,85	I	0,15	
10	0,5	I	0,25	0,75	I	0,15	
1	0,5		0,1	1,9	I	0,15	
2	0,5		0,2	1,8	I	0,15	
3	0,5		0,3	1,7	I	0,15	
4	0,5		0,4	1,6	I	0,15	
5	0,5		0,5	1,5	I	0,15	
1			0,1	2,4	I	0,15	
2			0,2	2,3	I	0,15	
3			0,3	2,2	I	0,15	
4			0,4	2,1	I	0,15	

Témoins :
sérum { 2
3
4
5

Témoins :
alexine { 1
2
3
4

A. *Antigènes-étalons* :

1^o Antigène méthylique de Boquet et Nègre :

a) Dilution atteinte : 1/500^e (2 titrages successifs).

b) Dose fixant 0 cm³ 25 d'alexine : 0 cm³ 2.

c) Activité au centimètre cube de la solution mère :

$$\frac{2,5 \times 500}{0,2} = 6.250.$$

d) Activité au milligramme : 1 cm³ contenant 0 mgr. 75
de substances, l'activité du milligramme est de $\frac{6.250 \times 4}{3}$
= 8.335 (8.350).

2^o Antigène de Besredka :

a) Dilution : 1/500^e.

b) Dose fixant 0 cm³ 25 d'alexine : 0 cm³ 3.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 500}{0,3} = 4.175$ (4.200).

B. *Les diverses fractions de Machebœuf* :

1^o *Fraction C₄ purifiée* :

a) Dilution atteinte : 1/500^e.

(Par conséquent, elle a nécessité deux titrages successifs.)

b) Dose fixant 0 cm³ 25 d'alexine : 0 cm³ 2 ; d'où :

c) Activité au centimètre cube de l'émulsion mère :

$$\frac{2,5 \times 500}{0,2} = 6.250.$$

d) Activité au milligramme : 12.500.

2^o *Fraction B₂ brute* :

a) Dilution atteinte : 1/5.000^e (3 titrages successifs).

b) Dose fixant 0 cm³ 25 d'alexine : 0 cm³ 9.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 5.000}{0,19} = 13.888$
unités (13.900).

d) Activité au milligramme : $13.888 \times 2 = 27.776$
(27.800).

3° Fraction B_2 purifiée :

a) Dilution atteinte : $1/5.000^e$.

b) Dose fixant 0 cm^3 25 d'alexine : 0 cm^3 7.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 50.000}{0,7} = 17.860$
(17.850).

d) Activité au milligramme : $17.860 \times 2 = 35.720$
(35.700).

4° Groupe $B_2 + B_3$:

a) Dilution atteinte : $1/500^e$.

b) Dose fixant 0 cm^3 25 d'alexine : 0 cm^3 2.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 500}{0,2} = 6.250$.

d) Activité au milligramme : 12.500.

5° Fraction B_3b :

a) Dilution atteinte : $1/50^e$.

b) Dose fixant 0 cm^3 25 d'alexine : 0 cm^3 2.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 50}{0,2} = 625$.

d) Activité au milligramme : 1.250.

6° Fraction acétonique totale :

a) Dilution atteinte : $1/50^e$.

b) Dose fixant 0 cm^3 25 d'alexine : 0 cm^3 6.

c) Activité au centimètre cube : $\frac{2,5 \times 50}{0,6} = 208$ (200).

d) Activité au milligramme : 416 (400).

7° Fractions C_2 , C_3 , Φ , β_1 , β_2 , B_3a :

Elles n'ont, à la dilution au $1/50^e$, de laquelle nous sommes parti, aucun pouvoir antigène.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS

Antigènes-étalons et fractions examinées	Nature chimique	Dilution à laquelle le pouvoir anticomplé- mentaire a disparu	Activité antigénique au milligramme (unités)
Antigène méthylique.	Substances lipoïdiques ac- compagnées de graisses et de cires.		8.350
Antigène de Besredka.	Suspension dans l'eau phy- siologique de bacilles tu- berculeux tués par la chaleur.		4.200
Fraction B ₂ purifiée.	Phospholipides complexes.	1 p. 30	35.700
Fraction B ₂ brute.	Phospholipides complexes accompagnés d'autres substances.	1 p. 30	27.800
Groupe B ₂ + B ₃ .	Phospholipides, glycérides de nature spéciale, subs- tances lipidiques sans glycérol.	1 p. 30	12.500
Fraction C ₄ purifiée.	Phospholipides accompa- gnés d'autres substances.	1 p. 40	12.500
Fraction B ₃ b.	Impureté phosphorée de nature mal connue.	1 p. 30	1.250
Fraction acétoni- que totale.	Graisses.	1 p. 40	400
Fraction C ₂ .	Substance acidorésistante non purifiée.	1 p. 30	Nulle
Fraction C ₃ .	Substance acidorésistante non purifiée.	1 p. 30	Nulle
Fraction Φ .	Substance acidorésistante notablement purifiée.	1 p. 30	Nulle
Fraction B ₃ a	Substance acidorésistante.	1 p. 30	Nulle
Fraction β_1 .	Glycérides de nature parti- culière avec traces de phosphore.	1 p. 20	Nulle
Fraction β_2 .	Substances lipidiques sans glycérol.	1 p. 20	Nulle

E. Interprétation des résultats.

A l'examen des résultats, on constate, que parmi les substances lipidiques et lipoïdiques extraites par Machebœuf, seule

la fraction B_2 présente *in vitro* un pouvoir antigène. Ce dernier est extrêmement élevé sur la fraction purifiée : il est 4,3 fois plus grand que celui de l'antigène classique de Boquet et Nègre.

La fraction acétonique totale (graisses) n'a qu'un pouvoir haptène insignifiant.

Quant aux fractions C_4 et B_3b et au groupe $B_2 + B_3$, ils ne manifestent l'aptitude à fixer l'alexine qu'en raison de l'existence parmi leurs composants — et l'étude des fractionnements de Machebœuf le montre — de la fraction B_2 elle-même. La purification de la fraction C_4 — constituée par de la fraction B totale — au moyen d'une précipitation par l'acétone à partir de sa solution chloroformique, explique, sa teneur en B_2 se trouvant ainsi augmentée, que son pouvoir haptène soit aussi élevé que celui du groupe $B_2 + B_3$.

Il est logique que leur activité soit inférieure à celle trouvée pour B_2 purifiée, puisque dans leur constitution rentrent en plus d'autres substances inactives, que la purification permet d'éliminer.

Enfin, la substance acidorésistante et les substances voisines représentées par les fractions C_2 , C_3 , Φ et B_3a se sont révélées n'avoir aucun pouvoir haptène.

F. Fixité du pouvoir antigène des fractions actives.

Nos titrages définitifs, dont nous venons d'exposer et d'interpréter les résultats, ont été effectués un mois et demi après les mises en émulsion des différentes fractions. Ils ont été précédés d'essais préliminaires, réalisés suivant la même technique et avec les mêmes éléments, à l'exception, toutefois, du sérum hémolytique. Cette variation dans ce dernier élément n'a pas eu — ceci en raison de l'emploi, dans tous les titrages, d'un grand excès de ce sérum par rapport aux hématies — de répercussions sur les résultats, qui ont toujours été identiques.

Le pouvoir haptène a donc pendant ce temps persisté dans les émulsions, lesquelles, malgré les précautions, n'ont pas été conservées dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

Ces résultats plaident dès lors en faveur de la fixité du pouvoir antigène *in vitro* de la fraction B_2 . Ce fait ne saurait d'ailleurs surprendre. Nous savons, en effet, que l'activité fixatrice des

fractions actives est extrêmement résistante à l'action de nombreux agents physiques ou chimiques, et notamment, que la stérilisation des bacilles par la chaleur, leur chauffage à l'air, l'épuisement par l'alcool bouillant, la laissent, en grande partie au moins, persister,

CONCLUSIONS

I. Parmi les substances lipidiques et lipoïdiques extraites récemment par Machebœuf et ses collaborateurs des bacilles tuberculeux tués par la chaleur, un seul groupe, peut-être même une seule substance, la fraction B₂, phospholipide complexe, dépourvu de glycérol, soluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme, insoluble dans l'acétone, possède l'aptitude à fixer l'alexine en présence de sérums antituberculeux.

Ce pouvoir haptène est extrêmement élevé ; sa fixité paraît certaine.

Il est, respectivement, 4,3 fois plus grand que celui de l'extrait méthylque de Boquet et Nègre et 8,5 fois supérieur à celui de l'antigène de Besredka, et c'est vraisemblablement à la substance isolée par Machebœuf que ceux-ci doivent leur activité.

II. Les autres sous-fractions lipidiques, appartenant aussi au groupe soluble dans l'alcool et insoluble dans l'acétone, fraction primordiale B (substances phosphorées très peu solubles dans l'éther, glycérides de nature spéciale et lipides sans glycérol), n'ont aucune activité.

III. Les fractions C₄ purifiée et B₃b manifestent *in vitro* un pouvoir antigène, assez considérable pour la première, plus faible pour la deuxième. Mais le fractionnement chimique montre qu'elles appartiennent l'une à la fraction B, l'autre à la fraction B₂ plus ou moins modifiée, et, du fait de l'inactivité des fractions B₁, β_1 et β_2 , leur pouvoir haptène doit être rattaché à la fraction B₂ elle-même. Les résultats chimiques se trouvent donc être confirmés par les résultats sérologiques. C'est là un point qu'étant donné l'esprit de notre thèse, nous ne pouvions manquer de signaler.

IV. La fraction acétonique totale (fraction A, graisses du bacille) n'a qu'un pouvoir haptène négligeable, pratiquement nul, sans doute dû à des traces de la fraction B.

Enfin, la substance acidorésistante (fractions C_2 , C_3 et Φ), que Machebœuf a isolée à un état de pureté assez avancé, ne manifeste *in vitro* aucun pouvoir antigène.

V. Les conclusions de notre travail permettent de localiser sur un groupe de principes immédiats le pouvoir haptène du bacille, que Boquet et Nègre, en raison de l'état moins avancé du fractionnement chimique, rapportaient à un mélange plus complexe : le groupe des substances lipidiques solubles dans l'alcool et insolubles dans l'acétone.

Elles *précisent* donc les résultats obtenus sur ce point par Boquet et Nègre, de même qu'elles confirment ceux constatés par ces mêmes auteurs relativement aux graisses et aux cires solubles dans l'acétone.

VI. Notre étude du pouvoir haptène des substances lipidiques et lipoïdiques du bacille constitue la première partie des recherches biologiques suscitées par les récents fractionnements de Machebœuf.

Ces recherches sont actuellement poursuivies, dans son laboratoire, par l'étude du pouvoir antigène *in vivo*, et, comme le commandent les résultats thérapeutiques très encourageants obtenus avec l'antigène de Boquet et Nègre, par celle de l'action thérapeutique sur la tuberculose expérimentale.

Vu : *Le Doyen*,
ROUSSY.

Vu : *Le Président*,
LEMIERRE.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 9 juin 1934.

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMAND-DELILLE et LAUNOY : Stabilisation des hématies par des doses minimes de formol. *C. R. Soc. Biol.*, 2 juillet 1910, p. 40.
- BESREDKA : Cultures des bacilles tuberculeux dans du jaune d'œuf. *Annales Institut Pasteur*, t. XXXV, mai 1921, p. 291.
- BOQUET et NÈGRE : Antigénothérapie de la tuberculose par les extraits méthyliques de bacilles de Koch. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1927.
- Valeur antigène des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et des émulsions de bacilles tuberculeux. *Revue de la Tuberculose*, t. I, 1920, n° 4, p. 257.
- Sur la recherche des anticorps tuberculeux par les extraits méthyliques des bacilles de Koch. *Revue de la Tuberculose*, t. II, n° 5, 1921, p. 366.
- Sur la propriété antigène *in vivo* des extraits méthyliques de bacilles de Koch. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXV, 18 mars 1922, p. 581.
- Sur les propriétés antigènes des extraits alcoolométhyliques de bacilles de Koch et des lécithines. *C. R. Soc. Biol.*, 1^{er} avril 1922, p. 717.
- Sur les propriétés biologiques des lipoides du bacille tuberculeux. *Annales Institut Pasteur*, t. XXXVII, p. 787.
- CALMETTE : L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1928.
- CALMETTE, BOQUET, NÈGRE : Manuel technique de microbiologie et sérologie. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1926.
- CALMETTE (A.) et MASSOL (L.) : Anticorps et antigènes tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 22 juillet 1911, p. 191.
- Préparation des antigènes tuberculeux. *Ibid.*, t. LXXI, 28 octobre 1911, p. 341.
- Détermination du pouvoir antigène des diverses tuberculines et titrage des sensibilisatrices ou anticorps des sérums des tuberculeux. *Ibid.*, t. LXXII, 6 janvier 1912, p. 15.
- DOPTER et SACQUEPÉ : Précis de Bactériologie. Baillière et Fils, éditeurs, Paris, 1931.
- GORIS : Composition chimique du bacille tuberculeux. *Annales Institut Pasteur*, 1920, p. 34-497.
- GORIS (A.) et STENDAL (N.). *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1933, t. XXXI, p. 1-13 et 65-76.
- MACHEBŒUF, G. LÉVY et Norbert FETHKÉ : « Essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur. » *Annales Institut Pasteur*, t. LII, mars 1934, p. 277-308.
- MASSOL et GRYZEZ : Influence du vieillissement et de la dessiccation sur la conservation de l'alexine du sérum frais de cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, 14 mai 1910, p. 825.
- MASSOL et NOWACZINSKI : Conservation et filtration de l'alexine de sérum de cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXIX, 19 novembre 1910, p. 431.

- NÈGRE (L.) et BOQUET (A.) : Sur le pouvoir antigène des extraits méthyl-
liques des bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIV, n° 2,
15 janvier 1921, p. 76.
- Recherches sur la valeur antigène des émulsions bacillaires et des
extraits méthyliques et éthyliques des bacilles tuberculeux. *Annales
Institut Pasteur*, t. XXXV, mai 1921, p. 300.
- Pouvoir antigène *in vivo* des bacilles de Koch et de leurs extraits.
Ibid., 25 mars 1922, p. 653.
- NICOLLE : Les antigènes et les anticorps. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris,
1920.
- PIETTRE : La méthode à l'acétone permet de localiser dans la sérum-
albumine l'hémolysine d'un immunsérum hémolytique. *C. R. Acad. Sc.*,
26 avril 1926, p. 1051.
- URBAIN (Ach.) : La réaction de fixation appliquée au diagnostic de
certaines maladies microbiennes ou parasitaires, communes à l'homme
ou aux animaux. Editions de la Revue de pathologie comparée et
d'hygiène générale, Masson et C^{ie}, Paris, 1927.
- VALTIS : Pouvoir antigène des bacilles diphtériques dans la réaction de
fixation de la tuberculose. *C. R. Soc. Biol.*, 21 octobre 1922, p. 947.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Introduction	II
Première partie.	
CHAPITRE PREMIER. — Aperçu sommaire sur les glucides, protides et matières minérales du bacille tuberculeux ..	17
Observations préliminaires	17
SECTION I. — Constitution minérale	18
SECTION II. — Glucides	19
SECTION III. — Protéides	21
CHAPITRE II. — Les substances lipidiques et lipoïdiques du bacille tuberculeux	27
SECTION I. — Les travaux antérieurs aux recherches de Goris	28
SECTION II. — Les résultats des travaux de Goris	30
SECTION III. — Les travaux d'Anderson	31
SECTION IV. — Exposé des essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoïdiques des corps bacillaires tués par la chaleur (recherches de Machebœuf).	
Remarques préliminaires	38
<i>Sous-section I.</i>	
§ 1 ^{er} . — But du travail	39
§ 2. — Matière première	40
§ 3. — Substances extraites	40
§ 4. — Techniques	41
§ 5. — Solvants utilisés pour l'épuisement des corps bacillaires	43
<i>Sous-section II.</i> — Obtention des fractions primordiales.	
Remarques préliminaires	44
§ 1 ^{er} . — Fraction acétonique	44
§ 2. — Fractions alcooliques B et C	46
§ 3. — Fractions D et E	46

	Pages
<i>Sous-section III. — Etudes des fractions primordiales (essais de fractionnement).</i>	
§ 1 ^{er} . — Fraction acétonique, ou fraction A.....	47
§ 2. — Fraction B	50
§ 3. — Fraction C	58
§ 4. — Fraction D	63
§ 5. — Fraction E	65
<i>Sous-section IV</i>	66
CHAPITRE III. — Choix et étude des antigènes-étalons ...	67
SECTION I. — L'antigène à l'œuf de Besredka	70
§ 1 ^{er} . — Sa préparation sommaire.....	70
§ 2. — Ses composants chimiques	71
§ 3. — Son pouvoir haptène	71
SECTION II. — Les extraits lipidiques partiels du bacille tuberculeux.	
<i>Sous-section I. — L'extrait méthylique direct de Petroff .</i>	72
<i>Sous-section II. — L'antigène méthylique de Boquet et Nègre</i>	73
§ 1 ^{er} . — Sa préparation	74
§ 2. — Ses composants chimiques	75
§ 3. — Son pouvoir haptène	76
§ 4. — Son pouvoir antigène <i>in vivo</i>	77
§ 5. — Son emploi dans la thérapeutique de la tuberculose	80
SECTION III. — La spécificité des antigènes tuberculeux	87

Deuxième partie.

Recherches sur le pouvoir haptène des substances lipidiques et lipoidiques extraites du bacille tuberculeux tué par la chaleur.

CHAPITRE PREMIER. — But du travail	92
CHAPITRE II. — La réaction de fixation du complément.	
SECTION I. — Le principe	93
SECTION II. — Le mécanisme	100
SECTION III. — Des conditions que doivent rigoureusement remplir, lors de titrages comparatifs d'antigènes, les éléments de la réaction de fixation	108

CHAPITRE III. — Technique du titrage du pouvoir haptène des substances lipidiques et lipoïdiques extraites des bacilles tués par la chaleur.

SECTION I. — Préparation des différents éléments de la réaction 111

Sous-section I. — Préparation de l'émulsion d'hématies lavées 112

Sous-section II. — Le sérum hémolytique.

1^o Sa préparation 113

2^o Son titrage 113

Sous-section III. — L'alexine.

1^o Son obtention 115

2^o Son titrage 116

Sous-section IV. — Le sérum antituberculeux type 118

A. Préparation d'un sérum antituberculeux riche en anticorps 119

B. Son titrage 119

Sous-section V. — Mise en émulsion et titrages préliminaires des diverses fractions.

§ 1^{er}. — Mise en émulsion 123

A. Technique générale 124

B. Technique spéciale à chaque fraction et observations faites au cours de la mise en émulsion.

1^o Les échecs 126

2^o Les fractions qu'il a été difficile d'émulsionner 127

3^o Les fractions qu'il a été facile d'émulsionner 128

§ 2. — Le titrage du pouvoir anticomplémentaire des fractions émulsionnées 129

A. Technique 130

B. Résultats 131

SECTION II. — Le titrage proprement dit du pouvoir haptène des fractions émulsionnées.

A. Choix d'une méthode 133

B. Doses des différents éléments de la réaction 134

C. Technique 135

D. Résultats 136

E. Interprétation des résultats 140

F. Fixité du pouvoir antigène des fractions actives 141

Conclusions 143

Bibliographie 145

IMPRIMERIES RÉUNIES DE CHAMBÉRY

3, Rue Lamartine, 3

33.551
